

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Antti Matvere

**Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioonimehhanismide uurimine hiire
granuloosarakkudes**

Magistritöö

Juhendajad:

PhD Tarmo Tiido

MSc Indrek Teino

TARTU 2015

SISUKORD

| | |
|--|-----------|
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 6 |
| 1.1. FOLLIKULOGENEES | 6 |
| 1.2. FOLLIKULOGENEESI HORMONAALNE REGULATSIOON | 7 |
| 1.3. GONADOTROPIINID JA NENDE RETSEPTORID | 8 |
| 1.4. GEENIDE EPIGENEETILINE REGULATSIOON MUNASARJAS | 9 |
| 1.5. ARÜÜLSÜSIVESINIKE RETSEPTOR | 10 |
| 1.6. AHR-I STRUKTUUR..... | 11 |
| 1.7. AHR-I KLASSIKALINE SIGNAALIRADA | 11 |
| 1.8. AHR-I TÄHTSUS REPRODUKTSIOONIS | 12 |
| 1.9. AHR-I EKSPRESSIOONI REGULATSIOON | 12 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 14 |
| 2.1. TÖÖ EESMÄRGID..... | 14 |
| 2.2. MATERJAL JA METOODIKA | 15 |
| 2.2.1. Rakud, söötmed, plasmiidid, kemikaalid | 15 |
| 2.2.2. Primaarsete granuloosarakkude eraldamine | 15 |
| 2.2.3. Ahr-i ekspressioonitaseme määramine | 16 |
| 2.2.3.1. RNA eraldamine | 16 |
| 2.2.3.2. cDNA süntees | 16 |
| 2.2.3.3. Kvantitatiivne reaalaja PCR (qPCR) | 16 |
| 2.2.4. SDS-PAGE ja Western blotting | 18 |
| 2.2.5. Transfekteerimine ja reportergeeni aktiivsuse määramine | 19 |
| 2.2.6. CHART-PCR | 19 |
| 2.2.7. Andmete statistiline analüüs | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3. TULEMUSED | 22 |
| 2.3.1. FSH/PMSG mõju Ahr-i valgu tasemele in vivo..... | 22 |
| 2.3.2. FSH/PMSG mõju Ahr-i mRNA tasemele in vivo | 23 |
| 2.3.3. Ahr-i ekspressiooni dünaamika in vivo | 24 |
| 2.3.4. PKA ja ERK-i signaalirajad Ahr-i regulatsioonis in vitro | 27 |
| 2.3.5. Ahr-i PMSG-st sõltuv transkriptsiooni määr in vivo..... | 28 |
| 2.3.6. PMSG mõju Ahr-i mRNA stabiilsusele in vitro | 29 |
| 2.3.7. PMSG mõju Ahr-i promootorala sisaldavalt reportervektorile in vitro..... | 30 |
| 2.3.8. Ahr-i ekspressiooni sõltuvus kromatiini struktuurist Ahr-i promootorala piirkonnas in vivo | 31 |
| 2.4. ARUTELU | 33 |
| KOKKUVÕTE..... | 39 |
| RESUMÈ..... | 40 |
| TÄNUAVALDUSED | 41 |
| KASUTATUD KIRJANDUS..... | 42 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 48 |
| LISAD..... | 49 |
| LISA 1. LOOMKATSETE LUBA | 49 |
| LIHTLITSENTS | 51 |

Kasutatud lühendid

ActD – aktinomütsiin D (*Actinomycin D*)

AHR – arüülsüivesinike retseptor (*Aryl Hydrocarbon Receptor*)

AHRE – AHR vastuselement (*AHR Response Element*)

AhrKO – AHR nokaut (*Ahr Knockout*)

AHRR – AHR repressor (*AHR Repressor*)

ARNT – AHR tuuma translokaator (*AHR Nuclear Translocator*)

bHLH – aluseline heeliks-ling-heeliks motiiv (*Basic Helix-Loop-Helix*)

CRE – cAMP vastuselement (*cAMP Response Element*)

ERK – ekstratsellulaarselt reguleeritud kinaas (*Extracellular Regulated Kinase*)

FICZ – 6-formüülindolo(3,2-b)karbasool (*6-Formylindolo(3,2-b)carbazole*)

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon (*Follicle Stimulating Hormone*)

FSHR – FSH retseptor

GnRH – gonadotropiine vabastav hormoon (*Gonadotropin Releasing Hormone*)

HAH – halogeenitud aromaadne süsivesinik (*Halogenated Aromatic Hydrocarbon*)

hCG – inimese koorioni gonadotropiin (*Human Chorionic Gonadotropin*)

Hsp90 – kuumašoki valk 90 (*Heat Shock Protein 90*)

LH – luteiniseeriv hormoon (*Luteinizing Hormone*)

LHR – luteiniseeriva hormooni retseptor (*Luteinizing Hormone Receptor*)

PAH – polütsükiline aromaadne süsivesinik (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*)

PAS A/B – Per-Arnt-Sim domään A/B

PMSG – tiine mära seerumi gonadotropiin (*Pregnant mare's serum gonadotropin*)

PKA – proteiinkinaas A

RÜ – rahvusvaheline ühik

SDS – naatrium-dodetsüül-sulfaat

Sissejuhatus

Dioksiinid on tuntud kui keskkonnas laialdaselt levinud saasteaineid, mis tekivad sageli tööstuslike protsesside kõrvalsaadustena. Neid ühendeid on seostatud paljude terviseprobleemidega, sealjuures kesknärvisüsteemi ning immuunsüsteemi häiretega. Dioksiinidel on täheldatud ka kantserogeenseid ning teratogeenseid omadusi. Viimaste aastakümnete jooksul on aktiivselt uuritud dioksiinide mõju ja toimemehhanisme organismis ning on avastatud, et nende toksilist mõju vahendab peamiselt arüülsüsivesinike retseptor (AHR).

Hiljuti on süvenenud teadmine, et lisaks dioksiinide metabolismile on AHR-il organismis ka oluline endogeenne funktsioon, muuhulgas on kinnitust leidnud AHR-i fundamentaalne tähtsus reproduktioonis. Seda näitavad katsed *knockout* hiirtega, kellel on täheldatud häireid follikulogeneesis. *Ahr*KO hiirtel on näidatud aeglasemat folliikulite kasvu, häireid östradioli sünteesis ning vähenenud reageerimisvõimet gonadotropiinidele.

Gonadotropiinide tähtsus follikulogeneesis on andnud põhjust uurida nende osalust ka AHR-i regulatsioonis. Preovulatoorsetes granuloosarakkudes on varasemalt näidatud luteiniseeriva hormooni (LH) represserivat mõju *AHR*-i ekspressioonile. Selle kohta, kuidas reguleeritakse granuloosarakkudes *AHR*-i folliikuli küpsemise käigus, pole teada midagi. Käesolevas töös uuriti folliikulite küpsemises kesksel kohal oleva folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) mõju *AHR*-i ekspressioonile ning sealjuures püüti seletada regulatsioonis osalevaid molekulaarseid mehhanisme.

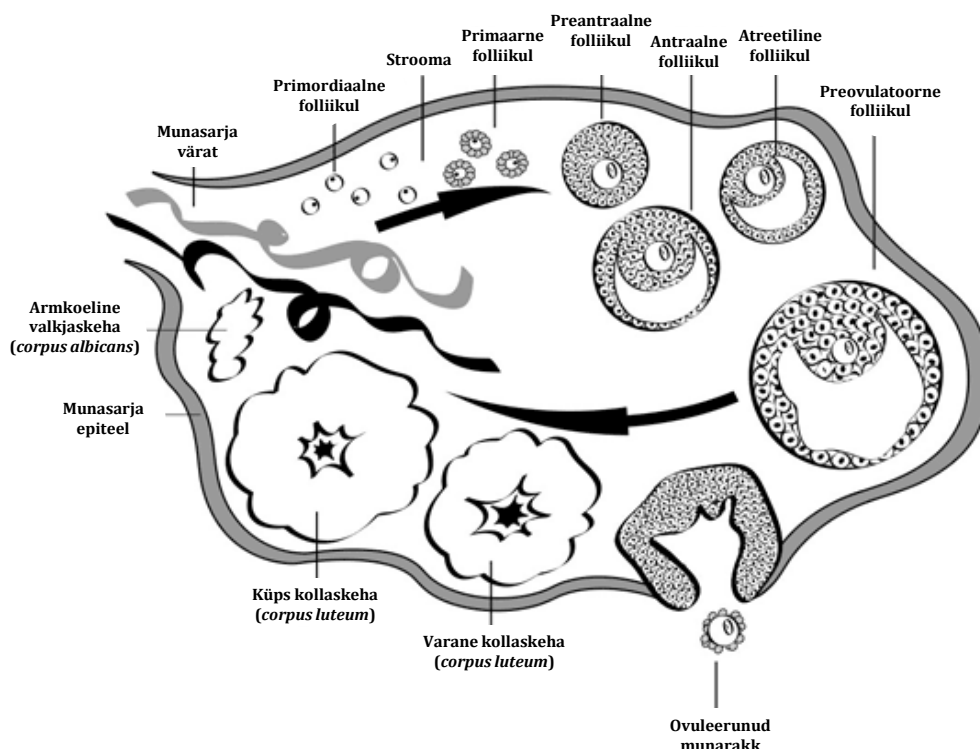
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Follikulogenees

Idutee rakkude areng saab alguse ekstraembrüonaalse ektodermi läheduses paiknevast epiblastist (Lawson ja Hage, 1994). Pluripotentsest rakupopulatsioonist liigub osa ekstraembrüonaalsesse mesodermi, kus vastusena mitmetele signaalidele diferentseeruvad primordiaalseks idutee rakkudeks. Hiire embrüos on need rakud eristatavad alates 7,25 embrüonaalsest päevast (*ingl. k. embryonic day* - ED) (Ginsburg jt, 1990). Genitaalvalli jõuavad sugurakkude eellasrakud ED 10,5 ning seda päeva saab lugeda munasarja arengu alguseks (Hirshfield, 1991). Primordiaalse idurakkude mitootilise jagunemise tagajärjel tekivad oogoonid, mis jäävad omavahel rakuliste sildadega ühendatuks. Moodustunud oogoonide kobar on ümbritsetud granuloosarakkude eellasrakkudega (Hirshfield, 1991; Pepling ja Spradling, 1998). Oogoonide mitootiline jagunemine peatub ED 13,5 ja algab esimene meiootiline jagunemine. Oogoonide suurenemise tagajärjel tekivad primaarsed ootsüüdid, millest enamik lähevad apoptoosi. Järele jäänud ootsüütides peatub meioos ED 17,5 esimeses diploteenis (Pepling ja Spradling, 2001). Organismi sünniks moodustuvad primordiaalsed folliikulid, kus ootsüüte ümbritseb ühekihiline lamendunud granuloosarakkude kiht. Tekkinud primordiaalseid folliikuleid saab organism fertiilse ea jooksul kasutada (Hirshfield, 1991).

Munaraku küpsemine ning follikulogenees on omavahel seotud protsessid. Ootsüütide ning seda ümbritsevate granuloosarakkude vahel toimub parakriinne signaliseerimine, mille kaudu stimuleeritakse granuloosarakkude arengut, reguleeritakse steroidogeneesi ning tagatakse meioosi jätkumine teatud arenguetappidel (Epifano ja Dean, 2002; Toda jt, 2001). Primordiaalse folliikuli küpsemise käigus transformeeruvad granuloosarakud kuubilaadseteks ja tekib primaarne folliikul. Sellele järgneb granuloosarakkude prolifereerumine ning moodustunud preantraalses folliikulis ümbritsevad granuloosarakud ootsüüti mitme kihina (vt Joonis 1). Edasise prolifereerumise tulemusena tekib antraalne folliikul (Kumar jt, 1997). Antraalse folliikuli arengut koordineerib folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH), tehes seda läbi granuloosarakkude pinnal paiknevate FSH retseptorite (FSHR) (Edson jt, 2009). Antraalsest folliikulist areneb edasi preovulatoorne folliikul östradioli mõjul, mida organismis vastusena FSH ning luteiniseeriva hormooni (LH) toimele toodetakse. LH järsu kontsentratsiooni tõusu tagajärjel toimub ovulatsioon ning folliikulist väljuv munarakk on peatunud teise jagunemise metafaasis (Richards jt, 2002). Olemasolevatest folliikulitest

ovuleerub vaid väike protsent. Seda põhjustab folliikulite degenerereerumine ehk atreesia (Kaipia ja Hsueh, 1997).



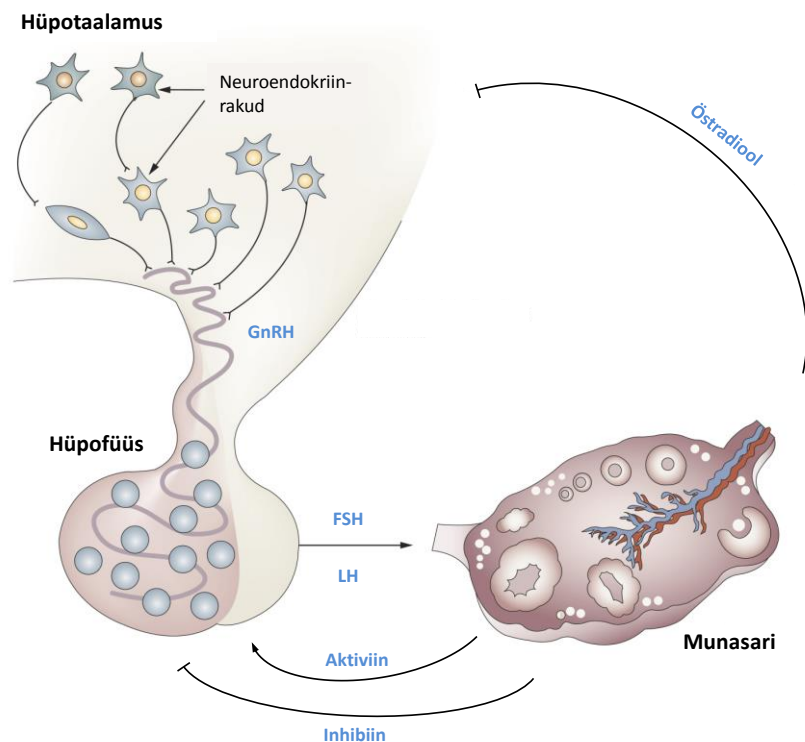
Joonis 1. Folliikuli arenguetapid (kohandatud http://www.infertile.com/brochures/biological_clock04.htm järgi).

1.2. Follikulogeneesi hormonaalne regulatsioon

Munasari on dünaamiline struktuur, kus paljude geenide koordineeritud avaldumine sõltub rangelt reguleeritud hormonaalsest tasakaalust. Steroidsete suguhormoonide (östrogeenide ning androgeenide) ning gonadotropiinide suur tähtsus follikulogeneesil on põhjuseks, miks igasugune kõrvalekalle nende normaalsest tasakaalust võib põhjustada hälbeid reproduktioonis. Hormonaalse tasakaalu regulatsioonis osaleb reproduktiivsüsteemis kesksel kohal olev hüpotaalamus-hüpofüüs-munasari telg (vt Joonis 2). Hüpotaalamuses sünteesitakse gonadotropiine vabastavat hormooni (GnRH), mis mõjutab hüpofüüsi eessagaras asuvaid GnRH retseptoreid omavaid rakke. Viimased hakkavad ekspresseerima gonadotropiine FSH ja LH. GnRH süntees hüpotaalamuses toimub erinevate intervallidena – suurem GnRH ekspressiooni soodustab FSH tootmist ning väiksem tingib LH sünteesi (Belchetz jt, 1978; Crowley jt, 1985; Hazum ja Conn, 1988).

Preantraalse folliikuli arengut antraalseks folliikuliks põhjustab hüpotaalamus-hüpofüüs-munasari-telje aktivatsioon. Kuigi preantraalsed folliikulid on võimelised FSH-le reageerima,

muutub FSH hädavajalikuks alles antraalses folliikulis (Kumar jt, 1997). Antraalsesse faasi jõudes hakatakse folliikuli teekarakkudes ekspresseerima LH-retseptoreid. Vastusena LH-le sünteesitakse ensüüme, mis konverteerivad kolesterooli testosterooniks (Drummond, 2006; Findlay jt, 2001; Richards, 1994). Testosteroon konverteeritakse granuloosarakkudes edasi östradiooliks. Östradiool omakorda tõstab hüpofüüsi eessagara tundlikkust GnRH suhtes ning suurendab gonadotropiinide produktsiooni (Donadeu ja Ascoli, 2005; Quinones-Jenab jt, 1996). Antraalses folliikulis toimub östradiooli vahendusel granuloosarakkude edasine proliferatsioon ning suureneb FSH ja LH retseptorite arv (Chen jt, 1977; Drummond, 2006). Jagunevad granuloosarakud suurendavad östradiooli tootmist, viimane soodustab granuloosarakkude paljunemist, mis omakorda võimendab östradiooli sünteesi munasarjas. Östradiooli kontsentratsiooni kasvades indutseeritakse järsk LH kontsentratsiooni tõus, mille tulemusena munarakk ovuleerub (Elsaesser jt, 1998; Moenter jt, 1990; Sarkar jt, 1976).



Joonis 2. Hüpotaalamus-hüpofüüs-munasari telg (Walker ja Gore, 2011 järgi).

1.3. Gonadotropiinid ja nende retseptorid

FSH ning LH on glükoproteiinsed gonadotropiinid, mis koordineerivad folliikuli küpsemist ning munaraku ovulatsiooni. Mõlemad hormoonid on heterodimeersed ja koosnevad alfa- ning beeta-ahelast. Gonadotropiinide toime avaldub läbi raku pinnal paiknevate retseptorite. FSH ja LH seondumise spetsiifilisus vastavalt FSH või LH retseptorile tuleneb nende erinevast beeta-ahelast (Edson jt, 2009). FSH retseptoreid ekspresseeritakse munasarjas ainult

granuloosarakkudes, kuid kõigis follikulogeneesi staadiumites (Bao ja Garverick, 1998). LH retseptoreid ekspresseeritakse see-eest lisaks teekarakkudele ka preovulatoorsete folliikulite granuloosarakkudes (Hsueh jt, 1984).

FSH ja LH retseptorid on seotud G-valkudega, mis initsieerivad ligandi seondumisel cAMP tõusu adenülaattsüklaasi vahendusel. On näidatud, et cAMP kontsentratsiooni tõus rakus põhjustab PKA aktiveerimist (Salvador jt, 2002). Gonadotropiinide mõju nende poolt aktiveeritavatele märklaudgeenidele võib lisaks PKA-le avalduda ka läbi teiste signaaliradade. Hiire granuloosarakkudes on FSH seondumisel FSHR-ile näidatud p38 MAPK, ERK ning Pi3K kinaasiradade aktiveerimist (Hunzicker-Dunn ja Maizels, 2006). LH seondumisel LHR-ile on näidatud ka PKC aktiveerimist (Manna jt, 1998). Lisaks on tekkinud arusaam, et konkreetse märklaudgeeni avaldumiseks on sageli vajalik erinevate kinaasiradade koostoime (Hunzicker-Dunn ja Maizels, 2006).

1.4. Geenide epigeneetiline regulatsioon munasarjas

FSH ning LH mõjul toimub munaraku arengut toetavate granuloosarakkude ja teekarakkude diferentseerumine, millega kaasnevad suurelatuslikud muutused nende rakkude geeniekspressioonis (Carletti ja Christenson, 2009). Hormonaalse stimulatsiooni tagajärjel võidakse reguleerida korraga sadu erinevaid gene. Diferentseeruvates rakkudes on näidatud, et geenide aktiveerimise või vaigistamise mehhanism on siiski rangelt selektiivne (Muller ja Leutz, 2001). Mehhanismid, mille kaudu selline regulatsioon toimub, on veel üsna ebaselged, kuid arvatakse, et need võivad olla sageli kontrollitud epigeneetilisel tasemel (LaVoie, 2005).

Munasarjas on näidatud mitmete oluliste steroidhormoone sünteesivate geenide avaldumise kontrolli läbi kromatiini struktuursete muudatuste. Preovulatoorsetes granuloosa- ja teekarakkudes on täheldatud progesterooni sünteesiks vajalike geenide *CYP11A1* ja *HSD3B* allareguleerimist kromatiini kondenseerumise kaudu nende geenide promootoralades (Nimz jt, 2010). Mitmed uuringud on tõestanud, et östradiooli sünteesiva aromataasi allaregulatsioon preovulatoorses folliikulis vastusena LH-le toimub samuti läbi kromatiini pakituse muutmise (Lee jt, 2013; Nimz jt, 2010). Follikulogeneesis tähtsa geeni *StAR* promootoralas on preovulatoorsetes granuloosarakkudes LH mõjul seevastu nähtud kromatiini decondenseerumist (Lee jt, 2013).

Andmed geeniekspressiooni uuringutes on viidanud kromatiini remodelleerivate ensüümide kaasamisele geenide reguleerimisesse piirkondadesse ja seeläbi nende osalemisele geenide aktiveerimisel või vaigistamisel (Berger, 2007). Kromatiini struktuuri muutused seostuvad

sageli DNA metülatsiooni ning histoonide kovalentse modifitseerimisega. Histoone modifitseeritakse kindlates regioonides peamiselt atsetüleerimise, metüleerimise, fosforüleerimise ning ubikvitinüleerimise kaudu (Cheng ja Blumenthal, 2010; Kondo, 2009; Lavrov ja Kibanov, 2007; Nan jt, 1998; Ng ja Bird, 1999). Kui DNA metülatsiooni seostatakse pigem geenide pikemaajalise vaigistamisega, siis histoonide kovalentsed modifikatsioonid on vähem stabiilsed, mistõttu peetakse neid sageli muutliku geeniekspressiooni oluliseks kontrollmehhanismiks (Iyer jt, 2011). Munasarjas kui dünaamilises struktuuris on tõestatud kromatiinivalkude modifitseerimise olulisus seal toimuvate füsioloogiliste protsesside regulatsioonis (LaVoie, 2005).

Transkriptsiooni regulatsioonist kromatiini struktuurse remodelleerimise kaudu diferentseeruvates granuloosarakkudes on üldiselt vähe teada. Kogunenud andmed on andnud alust arvata, et FSH ning LH võivad mõjutada kromatiiniga seotud mehhanismide kaudu lisaks steroidhormoonidele ka teisi follikulogeneesis olulisi geene. Hiljuti näidati, et hiire preovulatoorse folliikuli granuloosarakkudes repressseeritakse läbi kromatiini pakituse ka arüüsüsivesinike retseptori avaldumist (Teino jt, 2014).

1.5. Arüüsüsivesinike retseptor

Arüüsüsivesinike retseptor (Ahr) on ligand-aktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis on eelkõige tuntud kui keskkonnas levinud saasteainete (nt. dioksiinide) metabolismi vahendaja. AHR-i afiinsus on kõige kõrgem polühalogeense aromaatses ühendi TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiini) suhtes (Peters jt, 1999). Ligandi seondumisel Ahr-iga indutseeritakse rakus mitmete ksenobiootikumide lagundamises osalevate ensüümide ekspressiooni. Ahr kuulub PAS domääni sisaldavate transkriptsioonifaktorite ülempererekonda, mille funktsioon on keskkonnas toimuvatele muutustele reageerimine (Gu jt, 2000).

Ahr on evolutsiooniliselt konserveerunud transkriptsioonifaktor. Asjaolu, et selgrootute Ahr-il puudub dioksiinidega seondumise võime (Hahn, 2002) ja dioksiinide levik keskkonnas on evolutsioonilises mõistes uus nähtus, on andnud põhjust arvata, et Ahr-il on organismis ka füsioloogiline tähtsus. Lisaks dioksiinidele on leitud mitmeid endogeenseid ühendeid, mis on võimelised Ahr-i aktiveerima, nende hulgas biliverdiin, bilirubiin, FICZ, künureniin (Cuartero jt, 2014; Phelan jt, 1998; Wincent jt, 2012).

Praeguseks on kinnitust leidnud Ahr-i tähtsus mitmetes füsioloogilistes protsessides. Ahr-i *knockout* hiirtel on näidatud erinevaid füsioloogilisi probleeme, muuhulgas maksapuudulikkust (Floreani jt, 2013) ja häireid immuunsüsteemi normaalses toimimises (Bruhs jt, 2015). Ahr

reguleerib makrofaagide, dendriitrakkude ning lümfotsüütide aktiivsust, osaleb T-rakkude diferentseerumisel ja B-rakkude küpsemisel ning on üks võtmefaktoritest tsütokiinide vabastamises ja nende tasakaalu hoidmises (Nguyen jt, 2013). Uuringud on näidanud, et Ahr on oluline komponent rakutsükli regulatsioonis (Chang jt, 2014). On näidatud, et Ahr võib reguleerida raku apoptootilist aktiivsust (Bekki jt, 2015). Samuti on viidatud Ahr-i tähtsusele hematopoeetiliste tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel ning Ahr-i võimele mõjutada kasvajate progressiooni (Lindsay ja Papoutsakis, 2012).

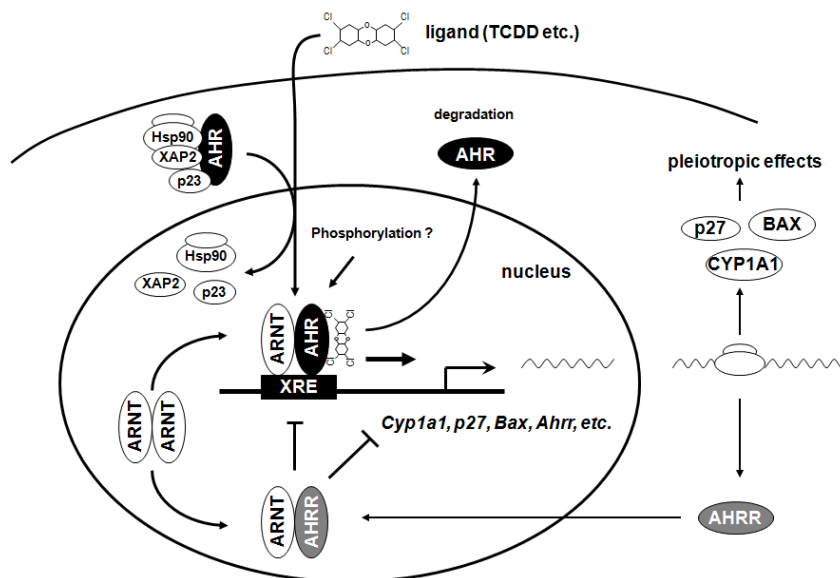
1.6. Ahr-i struktuur

Ahr on 96 kDa suurune aluseline heeliks-ling-heeliks (bHLH)/PAS tüüpi valk, mis koosneb 848 aminohappe jäägist. Ahr-il on konservatiivne N-terminaalne bHLH domään, mis on vajalik DNA-ga seondumiseks ning homo- või heterodimerisatsiooniks, ja konservatiivne PAS domään, mille eesmärk on seonduda *chaperonide* ja teiste PAS domääni sisaldavate valkudega (Gu jt, 2000). PAS domään sisaldab kahte hüdrofoobset kordusjärjestust – PAS A ning PAS B. AHR-i transaktivatsiooniliseks aktiivsuseks on tähtis C-terminaalne glutamiinirikas domään.

1.7. Ahr-i klassikaline signaalirada

Ligandiga mitteseondununa lokaliseerub AHR raku tsütoplasmas ning on seondunud erinevate valkudega. Viimaste hulka kuuluvad *chaperon* Hsp90 (*Heat Shock Protein*), *chaperon* p23 ning 38 kDa molekulmassiga valk XAP2 (*Hepatitis B Virus X-associated Protein*) (Meyer ja Perdew, 1999). AHR aktiveerub ligandiga seondumisel ning avaneb tuumalokalisatsiooni signaal, mille tagajärjel liigub AHR raku tuuma (Denison ja Nagy, 2003; Ikuta jt, 2004a), kus seondub bHLH motiivi sisaldava AHR-i tuuma translokaatori ARNT-iga (*AHR Nuclear Translocator*) (vt Joonis 3). Tekkinud dimeer seondub AHR-i vastuselemendile AHRE-le (*AHR Response Element*), mis asub mitmete ksenobiootikumide lagundamises osalevate geenide (*CYP1A1*, *CYP1A2*), aga ka AHR-i enda repressori AHRR-i (*AHR Repressor*) promootoralas (Baba jt, 2001; Denison jt, 1989; Whitlock, 1999).

AHRR-i ekspressioonitaseme suurenedes hakkab viimane seonduma ARNT-iga, takistades seeläbi AHR-i dimeriseerumist ARNT-iga. Sellele järgneb monomeerse AHR-i transport tagasi tsütoplasmasse ning AHR-i proteasoomne lagundamine. AHRR-il on ka teine sihtmärkgeenide ekspressiooni repressiivne toime – AHRR-ARNT dimeeri puhul on näidatud seondumist AHRE-le, kuid pole märgatud sihtmärkgeenide transaktiveerimist (Mimura jt, 1999; Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003).



Joonis 3. Ahr-i signaalirada (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003 järgi).

1.8. Ahr-i tähtsus reproduksioonis

Praeguseks on teada, et Ahr omab olulist tähtsust follikulogeneesis (Hernandez-Ochoa jt, 2009). *Ahr-i knockout (AhrKO)* hiirtel on võrreldes metsiktüüpi hiirtega näidatud aeglasemat folliikulite kasvu (Barnett jt, 2007a; Barnett jt, 2007b) ning vähenenud preantraalsete ja antraalsete folliikulite arvu (Benedict jt, 2000). *AhrKO* hiirte munaraku tugirakkudes on näidatud FSH ning LH retseptorite vähenemist ning seega ka vähenenud FSH ja LH mõju folliikulite küpsemiseks ning ovulatsiooni toimumiseks (Hernandez-Ochoa jt, 2010).

Folliikulite küpsemiseks ning ovulatsiooni toimumiseks on vajalik gonadotropiinide stimuleeritud steroidogenees. FSH mõjul suureneb granuloosarakkudes aromataasi *Cyp19A1* ekspressioon (Richards, 1994), mis on võtmeensüümiks östradiooli produktsioonis. Östradiooli suurt tähtsust follikulogeneesis on omakorda tõestanud katsed aromataasi *knock-out (ArKO)* hiirtega (Fisher jt, 1998). Veelgi enam – on leitud, et Ahr-i olulisus normaalses follikulogeneesis seisneb suuresti aromataasi ekspressiooni reguleerimises (Baba jt, 2005), millest järeldub ka Ahr -i tähtsus östradiooli produktsioonis ja seeläbi kogu follikulogeneesis.

1.9. Ahr-i ekspressiooni regulatsioon

Hiire *Ahr-i* promootoralal on tehtud kindlaks mitmete transkriptsioonifaktorite seondumisjärjestused, nende seas AP1, AP2, Sp1, GRE, CRE, NF. Ühtlasi on teada, et *Ahr-i* promootoralas puudub TATA box (Mimura jt, 1994; Schmidt jt, 1993). *Ahr* geeni 5'-deletsioonianalüüsid näitasid, et *Ahr-i* konstitutiivseks ekspressiooniks on vajalik järjestus,

mis asub *Ahr*-i promootori vahemikus -184 bp kuni +380 bp. Konstitutiivset ekspressiooni repressiivne järjestus asub transkriptsiooni alguspunktist -1431 bp kuni -721 bp ülalpool asetsevas regioonis (Garrison ja Denison, 2000).

Hiljuti on tähelepanu pööratud *Ahr*-i võimalikule regulatsioonile histoonimodifikatsioonide kaudu. On näidatud, et *Ahr*-i geeniekspressiooni muutused võivad sõltuda promootoralaga seotud histoonide atsetüleeritusest (Garrison jt, 2000). Hiire maksarakkudes on histoonide deatsetüleeriva ensüümi toime peatamisel nähtud märkimisväärset *Ahr*-i geeniekspressiooni suurenemist (Zhang jt, 1996). Veelgi enam – maksarakkudes on täheldatud olulist seost *Ahr*-i ekspressiooni ning histoonide metüleerimise vahel (Cui jt, 2009). Hiljutise uuringu käigus selgus, et hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes on *Ahr*-i madal ekspressioonitase kontrollitud kromatiini remodelleeriva PcG (*ingl. k. Polycomb Group*) kompleksi kaudu (Ko jt, 2014).

Kuna Ahr on munasarjas oluline valk, on olnud põhjust uurida *Ahr*-i ekspressiooni sõltuvust gonadotropiinidest. LH analoogi hCG (*human Chorion Gonadotropin*) mõjul on reesusahvi perioovulatoorsetes granuloosarakkudes nähtud *Ahr*-i ekspressiooni suurenemist (Chaffin jt, 1999), rotil seevastu on tõestatud seos LH ning *Ahr*-i allaregulatsiooni vahel (Chaffin jt, 2000). Mitmed uuringud on viitanud ka FSH ning *Ahr*-i regulatsiooni seosele. Roti granuloosarakkudes on märgatud FSH inhibeerivat mõju *Ahr*-i avaldumisele *in vitro* (Bussmann ja Baranao, 2006).

Meie laboris näidati hiljuti, et hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes toimub vastusena LH-le arüüsüsivesinike retseptori allaregulatsioon nii valgu kui ka mRNA tasemel. Tõestati, et repressioonis on oluline PKA, kuid mitte ERK-i kinaasirada ning repressioon toimub sünteesi vähendamise, mitte mRNA degradatsiooni kaudu. Muuhulgas leidis kinnitust, et *Ahr*-i allaregulatsiooniks pole vajalik *de novo* valgusüntees. Olulise asjana avastati, et LH mõjul suureneb kromatiini kondensatsioon *Ahr*-i promootoala piirkonnas (Teino jt, 2014).

Korduvalt on leitud tõestust *Ahr*-i tähtsusest folliikulogeneesis (Hernandez-Ochoa jt, 2010; Hernandez-Ochoa jt, 2013) ning üht-teist on teada *Ahr*-i regulatsioonist folliikuli preovulatoorses faasis vastusena LH-le. Andmed sellest, kas ja kuidas on *Ahr* munasarjas reguleeritud folliikuli küpsemise ajal, on see-eest puudulikud. Käesolevas magistritöös ongi keskendutud *Ahr*-i regulatsioonimehhanismide kirjeldamisele folliikuli küpsemise ajal. Huvi on pakkunud küsimus, kas FSH mõjutab hiire granuloosarakkudes arüüsüsivesinike retseptori valgu ja mRNA taset ja sealjuures selgitada, milliste molekulaarsete mehhanismide kaudu FSH mõju *Ahr*-i regulatsioonile avaldub.

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

1. Iseloomustada FSH/PMSG mõju *Ahr*-i mRNA ning valgu tasemele, sealjuures kirjeldada ekspressiooni dünaamikat.
2. Uurida PKA ja ERK signaaliradade olulisust FSH/PMSG-toimelises *Ahr*-i regulatsioonis.
3. Teha kindlaks, kas *Ahr*-i transkripti taset rakkudes kontrollitakse mRNA stabiilsuse ja/või sünteesi kaudu.
4. Saada selgust, kas muutused *Ahr*-i ekspressioonis toimuvad promootori aktiivsuse ja/või kromatiini remodelleerimise vahendusel.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Rakud, söötmed, plasmiidid, kemikaalid

Töös kasutati kuni 140 emast C57Bl/6J hiirt. Loomkatsete läbiviimiseks väljastatud loa (22. mai 2014. a nr 33) koopia on leitav magistritöö lisadest (vt Lisa 1.). Loomkatsed viidi läbi TÜ MRI vivaariumis ning katsed elusloomadega teostasid Sulev Kuuse ning Indrek Teino.

Eksperimentide läbiviimiseks kasutati hiirte munasarjadest eraldatud primaarseid granuloosarakke. Rakke kasvatati DMEM/Ham's F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12; PAA) söötmes koekultuuri tassidel 5 % CO₂ kontsentratsioonil 37 °C juures. Reportergeeni analüüsiks kasutati töögrupis varasemalt konstrueeritud *Ahr*-i promootorala sisaldavat pGL3-basic (Promega) vektorit, aktiivsuse hindamiseks kasutati kontrollina tühja pGL3-basic vektorit ning transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks pSV-β-Gal (Promega) vektorit. Töös kasutati kemikaale aktinomütsiin D (AppliChem), H89 (Santa Cruz) ja U0126 (Calbiochem).

2.2.2. Primaarsete granuloosarakkude eraldamine

Folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) mõju uurimiseks granuloosarakkudes süstiti 21-23 päeva vanuseid immatuurseid hiiri 5 rahvusvahelise ühiku (RÜ) FSH-ga (Gonal-f, MerckSerono) või sellega analoogse hormooni tiine mära seerumi gonadotropiiniga (PMSG) (Folligon, Intervet), ühes eksperimendis 5 RÜ luteiniseeriva hormooniga (LH) (Luveris, MerckSerono). Kontrolliks süstiti hiirtele samas mahus PBS-i. Vastavalt katse ülesehitusele hukati hiired tservikaalset dislokatsiooni kasutades enne süstimist või 12, 24, 36 või 48 tundi pärast süstimist. Hiirtest eraldati munasarjad ning asetati need lahusesse A (DMEM/Ham's F-12, 0,2% BSA, 10 mM Hepes pH 7,5) ja eemaldati ümbritsev sidekude. Munasarju inkubeeriti 5-10 minutit hüpertoonilises lahuses B (DMEM/Ham's F-12, 0,5 M sahharoos, 10 mM EGTA) 37 °C juures. Seejärel pesti munasarju üks kord lahusega A. Munasarjad asetati koekultuuri tassidele ning punkteeriti 26G nõelaga u 200 µl lahuses A. Granuloosarakud koguti kokku lahuses A, tsentrifuugiti 250 g juures 5 minutit ja eemaldati supernatant, misjärel käsitleti rakke vastavalt järgnevale eksperimentaalsele protseduurile. *In vivo* katsetes rakud lüüsiiti. *In vitro* eksperimentide läbiviimiseks külvati rakud koekultuuri tassile 2,5% seerumit sisaldavasse DMEM/Ham's F-12 söötmesse. Tasse inkubeeriti eelnevalt 1 h jooksul 1 µg/cm² fibronektiiniga (Biopur AG) 37 °C juures. Seerumist tingitud mõjutuste vältimiseks hormonaalses regulatsioonis vahetati pärast rakkude kinnitumist tassile seerumit sisaldav sööde seerumvaba söötmega.

2.2.3. *Ahr*-i ekspressioonitaseme määramine

2.2.3.1. RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kasutati Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Kit-i (Favorgen). RNA eraldati vastavalt tootja protokollile ning elueeriti sobivas koguses nukleaasivabas vees. Lahuste kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetrit NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). RNA säilitati -80 °C külmakambris. Vältimaks, et hiljem qPCR-is nähtav amplifikatsioon ei tulene genoomsest DNA-st, teostati eraldatud RNA lahusele DNase I (Thermo Scientific) töötlus vastavalt tootja protokollile.

2.2.3.2. cDNA süntees

cDNA sünteesiks kasutati 100-1000 ng granuloosarakkudest eraldatud ja DNAasiga töödeldud RNA-d ning RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo Scientific). Reaktsioonid viidi läbi vastavalt tootja protokollile lõppmahus 20 µl, kasutades 2720 Thermal Cycler PCR masinat (Applied Biosystems). Reaktsioonide teostamiseks kasutati järgnevat programmi:

Tabel 1. Pöördtranskriptsiooni programm

| Toiming | Temperatuur | Aeg |
|----------------|-------------|--------|
| Aktivatsioon | 25 °C | 10 min |
| Süntees | 42 °C | 60 min |
| Inaktivatsioon | 70 °C | 10 min |

cDNA säilitati edasiseks kasutamiseks -20 °C külmikus.

2.2.3.3. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qPCR)

qPCR-i teostamiseks kasutati LightCycler[®] 480 II (Roche) masinat ja reaktsioonid viidi läbi LightCycler[®] 480 Multiwell Plates 384 (Roche) plaatidel. Katsed mõõdeti duplikaatidena ning mõõtmistulemuste analüüsimisel arvestati duplikaatide keskmisi. Reaktsioonisegu (lõppmahus 10 µl) sisaldas 5 µl 2X Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Scientific), 0,5 µl 10 µM *forward* praimerit, 0,5 µl 10 µM *reverse* praimerit ning 4 µl cDNA lahust. Ühe reaktsiooni jaoks kasutati 10-100 ng cDNA-d. Reaktsioonide teostamiseks kasutati järgnevat programmi:

Tabel 2. qPCR-i programm

| Toiming | Temperatuur | Aeg | Tsükli arv |
|-------------------------------------|-------------|--------|------------|
| Algne denaturatsioon | 95 °C | 10 min | 1 |
| Denaturatsioon | 95 °C | 15 sek | 40 |
| Praimerite seondumine ja süntees | 60 °C | 60 sek | |
| Lõplik ekstensioon | 72 °C | 5 min | 1 |
| Sulamiskõver | 45 – 95 °C | 7 min | 1 |

Kõikide reaktsioonide lävitsüklid arvutati LightCycler 480 tarkvara abil. Huvipakkuva produkti ning reaktsiooni käigus tekkivate võimalike lisaproductide esinemise tuvastamiseks kasutati sulamiskõvera analüüsi. Katsete tulemused normaliseeriti *Gapdh* väärtustega. Relatiivsed tasemed arvutati Livak'i meetodit kasutades (Livak ja Schmittgen, 2001). qPCR-is kasutati järgnevaid oligonukleotiide:

Tabel 3. Töös kasutatud oligonukleotiidid

| Praimer F-Forward/R-Reverse | Järjestus |
|-----------------------------|--------------------------------|
| AHR_mRNA_F | 5'-GGCCAAGAGCTTCTTTGATG-3' |
| AHR_mRNA_R | 5'-TGCCAGTCTCTGATTTGTGC-3' |
| AHR_pre-mRNA_E1-I1_F | 5'-CAAGCCGGTGCAGAAAAC-3' |
| AHR_pre-mRNA_E1-I1_R | 5'-CATTGGTTGAGACTCAGCTCC-3' |
| CYP19A1_mRNA_F | 5'-GCCTCCTTCTCCTGATTTGGA-3' |
| CYP19A1_mRNA_R | 5'-CTGCCATGGGAAATGAGGG-3' |
| LHCGR_mRNA_F | 5'-AGTCACAGCTGCACTCTCC-3' |
| LHCGR_mRNA_R | 5'-GTGAGAGATAGTCGGGCGAG-3' |
| GAPDH_mRNA_F | 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' |
| GAPDH_mRNA_R | 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3' |
| AHR_promootor_F | 5'-TTTTGAGGCTGGAAAACAGGTACT-3' |
| AHR_promootor_R | 5'-ACGTGATGACGCAGGACGTA-3' |

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| CYP19A1_promootor_F | 5'-CCAATCCAGCACCTTCCAA-3' |
| CYP19A1_promootor_R | 5'-GGGAAGAAAGCAGTGGTGGGA-3' |
| StAR_promootor_F | 5'-GCTTTCCCCTACCTGCAGAG-3' |
| StAR_promootor_R | 5'-TGTGCAGAGGGTCAAGGATG-3' |
| PAX7_promootor_F | 5'-GTTATCGGTCCCCTCTCCCT-3' |
| PAX7_promootor_R | 5'-CTCAACGGCAGGGAAGGG-3' |

2.2.4. SDS-PAGE ja Western blotting

Western blot analüüsiks lüüsi eraldatud primaarsed granuloosarakud RIPA puhvris (50 mM Tris pH 7.4, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS), kuhu oli lisatud 1 X proteaasi inhibiitori segu (Roche). Lüsandid homogeniseeriti 26G nõelaga, hoiti 45 - 60 minutit jääl aeg-ajalt segades. Lüsate kuumutati 1 X *Protein loading* puhvris (Thermo Scientific) 95 °C juures 5 minutit. Valgud lahutati 10 % SDS-polüakrüülamiid geelelektroforeesil Mini-PROTEAN® Tetra Cell masinas (Bio-Rad). Markerina kasutati Page Ruler™ valguredelit (Thermo Scientific). Foreesi lõppedes hoiti geeli ülekandepuhvris (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glütsiin, 10% metanool, 0,1% SDS) loksutil 5 minutit. Valkude ülekandmiseks geelilt polüvinülideenfluoriid (PVDF) membraanile (Thermo Scientific) kasutati Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell masinat (Bio-Rad). Ülekanne teostati 15 V juures 17 minutit. Mittespetsiifilise signaali blokeerimiseks inkubeeriti membraani 1 tund toatemperatuuril loksutil 5% lõssipulbrit sisaldavas TBST puhvris (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5). Membraani inkubeeriti vastavate primaarsete antikehadega loksutil üleöö 4 °C juures. Primaarsete antikehadena kasutati küüliku polükloonaalset Ahr-i vastast IgG-d (Biomol) ning aktiini vastast IgG-d (Santa Cruz Biotechnology). Membraane pesti TBST puhvris 4 korda 6 minutit ning 1 kord 9 minutit. Järgnevalt inkubeeriti membraani 1 tund sekundaarset antikeha sisaldavas lõssilahuses, milleks kasutati HRP-ga konjugeeritud küüliku-vastast kitse antikeha (Thermo Scientific). Signaali visualiseerimiseks kasutati *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* komplekti (Millipore). Reaktsioonisegu kanti membraanidele ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Membraanil olev signaal tuvastati röntgenfilmiga (Agfa), mis ilmutati ja kinnistati standardlahustega (Agfa). Densitomeetria analüüs teostati, kasutades programmi ImageJ.

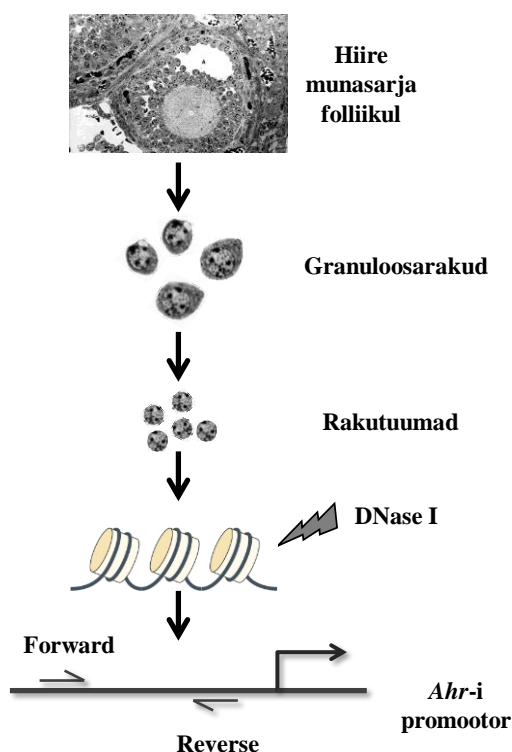
2.2.5. Transfekterimine ja reportergeeni aktiivsuse määramine

Primaarsed granuloosarakud külvati 24-kannulisele koekultuuri plaadile 2,5 % seerumiga DMEM/Ham's F-12 söötmesse. Pärast rakkude kinnitumist, 2 tundi hiljem, vahetati sööde seerumvaba söötme vastu, misjärel näljutati rakke 1 tunni jooksul. Seejärel transfekteriti rakke, kasutades Turbofect In Vitro Transfection reagenti (Thermo Scientific) vastavalt tootja protokollile. Rakke transfekteriti 1792-aluspaarilist *Ahr*-i promootorala sisaldava pGL3-basic vektoriga (500 ng kannu kohta), *Ahr*-i promootorala aktivatsiooni kontrollimiseks transfekteriti *Ahr*-i promootorala mittesisaldavat pGL3-basic vektorit (365 ng kannu kohta). Transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks ko-transfekteriti rakke pSV- β -Gal vektoriga (50 ng kannu kohta). Transfektsiooni toimumiseks ning reportergeeni avaldumiseks inkubeeriti rakke 3-5 tundi, pärast mida vahetati sööde hormooni või kontroll-lahust sisaldava söötme vastu. Hormooni mõju uurimiseks inkubeeriti rakke kuni 48 tundi, misjärel eemaldati rakkudelt sööde, pesti 1 kord PBS-iga ning lüüsi. Mõõdetud lutsiferaasi aktiivsusest tulenevad luminesentsi väärtused normaliseeriti β -galaktosidaasi väärtustega, kasutades Dual-Light® System komplekti (Applied Biosystems) ning luminomeetrit Glomax™ 20/20n (Turner BioSystems) vastavalt tootja protokollile.

Transfekterunud rakkude osahulga määramiseks kogu rakupopulatsioonist kasutati läbivoolutsütomeetriat. Selleks teostati transfektsioon sarnaselt kirjeldatud katseskeemile, kuid rakke transfekteriti meie laboris varasemalt konstrueeritud AHR-i ning kollast fluorestseeruvat valku sünteesiva AHR-EYFP plasmiidiga (Invitrogen). Transfekterimiseks kasutati Turbofecti ning Reagent 007 (Icosagen) vastavalt tootjapoolsele protokollile. 48 tundi hiljem eemaldati rakkudelt sööde, pesti 1 kord PBS-iga, koguti tuubi, tsentrifuugiti, suspendeeriti PBS-is ning inkubeeriti DAPI-ga. Läbivoolu tsütomeetria teostati TÜ MRI FACS-i laboris.

2.2.6. CHART-PCR

Kromatiini struktuuri kohta esmase info leidmiseks uuritavas genoomi piirkonnas on asjakohaseks meetodiks CHART-PCR (*Chromatin accessibility by real-time PCR*). Metoodika põhineb DNAasi ligipääsetavuse tuvastamises spetsiifilisele järjestusele DNA-s ja lähtub eeldusest, et avatud avatud kromatiini tingimustes on DNAasi ligipääsetavus suurem ning suletud kromatiini tingimustes väiksem. Protsessi käigus eraldatakse rakkudest tuumad, töödeldakse neid DNAasiga, puhastatakse genoomne DNA ja erinevused DNAasi ligipääsetavuses huvipakkuvale järjestusele tuvastatakse qPCR-i teel (vt Joonis 4.)



Joonis 4. CHART-PCR-i meetodika DNAasi ligipääsetavuse hindamisel *Ahr-i* promootoralale.

DNAasi ligipääsetavuse testimiseks huvipakkuvatele geenijärjestustele koguti granuloosarakud kokku 1,5 ml tuubidesse, tsentrifuugiti põhja ning aspireeriti sööde. Rakud külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures. Degradatsiooni vältimiseks teostati tuumade eraldamise protsess jääl. Tuumade eraldamiseks sulatati rakud ning suspendeeriti need 400 µl LS-puhvrts (10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,25 M sahharoos, 0,5 mM DTT, 1 X proteaasi inhibiitor (Roche), 0,5 % BSA) ning inkubeeriti 30 minutit jääl. Rakumembraani lõhkumiseks lisati 25 µl 10 % NP-40 ning tõmmati suspensioon süstlaga 7-8 korda läbi 26G nõela. Tuumasid inkubeeriti 1-2 minutit jääl ning tsentrifuugiti põhja 5000 g juures 1 minuti jooksul. Supernatant eemaldati ja tuumad suspendeeriti pesemiseks 400 µl LS-puhvrts. Tuumad tsentrifuugiti uuesti põhja (5000 g, 1 min), eemaldati supernatant ja suspendeeriti 600 µl D-puhvrts (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 µg/ml BSA, 1 X proteaasi inhibiitor). Suspensiooni lisati MgCl₂ (10 mM), CaCl₂ (0,4 mM), jaotati kolmeks (3 x 200 µl) ja lisati vastavalt 0, 10 või 20 ühikut DNAasi (Thermo Scientific). DNAasi reaktsiooniks inkubeeriti tuumasid 5 minutit jääl ning 15 minutit 4 °C külmikus. Reaktsioon peatati 10 µl 0,5 M EDTA lisamisega. Reaktsioonisegudele lisati juurde 200 µl P-puhvrit (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) ning inkubeeriti 45 °C juures

üleöö. Genoomne DNA puhastati, kasutades NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kiti ja NTB puhvrit (mõlemad Macherey-Nagel) vastavalt tootja protokollile. DNAasi ligipääsetavuse ja seeläbi kromatiini struktuuri kohta tehti järeldused, amplifitseerides uuritavaid DNA järjestusi qPCR-i teel.

2.2.7. Andmete statistiline analüüs

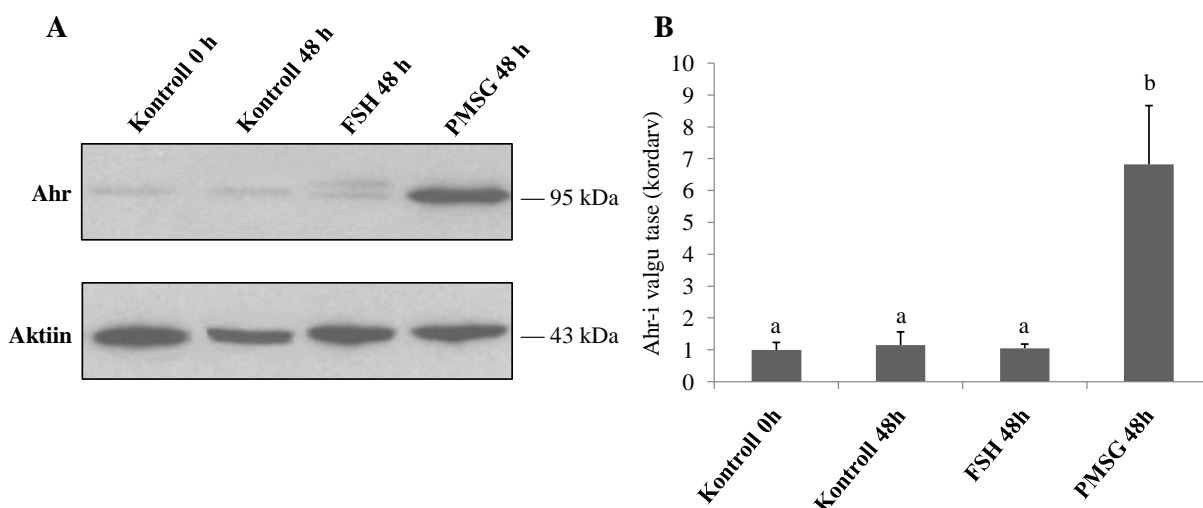
Katsed sooritati käesolevas töös kolmes korduses ja tulemused on esitatud korduste keskmistena koos veapiiridega. Veapiiridena kasutati standardvea väärtusi, statistilise olulisuse mõõtmiseks kasutati MS Exceli t-testi ning statistiliselt oluliseks p-väärtuseks loeti $p < 0,05$.

2.3. Tulemused

2.3.1. FSH/PMSG mõju Ahr-i valgu tasemele *in vivo*

Varasemalt oleme näidanud, et hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes toimub vastusena LH-le arüüsüsivesinike retseptori allaregulatsioon nii mRNA kui ka valgu tasemel (Teino jt, 2014). Käesolevas töös uurisime, kas ja kuidas muutub *Ahr*-i ekspressioon hiire granuloosarakkudes folliikulite küpsemisel, sealjuures kas ja kuidas sõltub ekspressioon FSH-st kui folliikulite küpsemisel osalevast võtmehormoonist.

Lähtudes klassikalisest eeldusest, et geenile funktsionaalse tähtsuse omistamiseks on vajalik selle avaldumine valgu tasemel, alustati eksperimente *Ahr*-i valgu taseme määramisega. Selleks kasutati 21-23 päeva vanused hiiri, kes hukati koheselt või süstiti PBS-i, 5 RÜ FSH või PMSG-ga. PMSG on hormoon, mis kutsub esile folliikulite küpsemise ning seda kasutatakse rutiinselt superovulatsiooni esilekutsumiseks. PMSG-l on organismis pikem poolestusaeg ning erinevalt FSH-st omab see ka mõningast LH-aktiivsust (võime aktiveerida LH retseptoreid). 48 tundi pärast hormooni/PBS-i süstimist hukati hiired, eraldati folliikulitest granuloosarakud, mis seejärel lüüsi. Valgu tasemed määrati *Western blot* meetodil, valgukoguste mõõtmiseks kasutati *Ahr*-i ning aktiini vastaseid antikehasid. Muutused valkude kogustes on välja toodud joonisel 5.



Joonis 5. FSH ning PMSG mõju Ahr-i valgu tasemele *in vivo*. **A.** *Western blot*il täheldati PMSG-st, kuid mitte FSH-st tingitud Ahr-i valgu taseme tõusu. **B.** *Western blottide* densitomeetria analüüs osundas Ahr-i valgu keskmiselt 7-kordsele tõusule. Tulemus põhineb kolmel iseseisval katsel. Erinevad tähed tulpade kohal tähendavad statistiliselt olulist erinevust ($p < 0,01$).

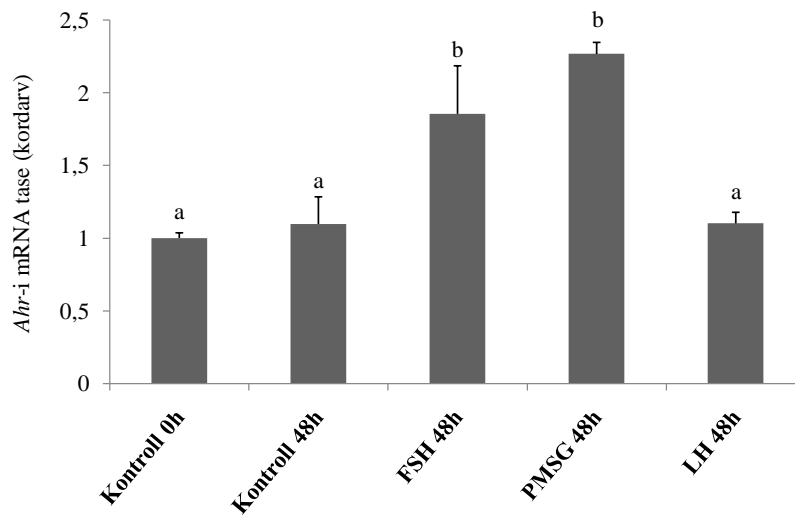
Katse tulemustest selgus, et PMSG süstimine hiirtele tõstab granuloosarakkudes statistiliselt olulisel määral ja keskmiselt kuni 7 korda *Ahr*-i valgu hulka ($p < 0,01$), FSH puhul seevastu märgatavat muutust ei täheldatud. Kontrollkatses PBS-iga süstitud hiirte granuloosarakkudes jääb *Ahr*-i tase 48 tunni jooksul samuti muutumata.

2.3.2. FSH/PMSG mõju *Ahr*-i mRNA tasemele *in vivo*

Rakkudes aset leidvad muutused valgu hulgas kaasnevad sageli muutustega vastava mRNA koguses. Seetõttu otsustati järgnevas katses uurida, kas eelnevalt nähtud *Ahr*-i valgu taseme muutused on kooskõlas mRNA ekspressiooni muutustega. Selleks kasutati 21-23 päeva vanused hiiri, kes hukati koheselt või süstiti PBS-i, 5 RÜ FSH või PMSG-ga. Kontrollimaks, kas PMSG-st tingitud *Ahr*-i valgu taseme tõus tuleneb kindlasti FSH-aktiivsusest, süstiti hiiri ka 5 RÜ LH-ga. 48 tundi pärast süstimist hukati hiired, eraldati granuloosarakud, lüüsi need ning eraldati totaalne RNA. RNA lahusele teostati DNAasi töötlus ja pöördtranskriptsioon. Saadud cDNA-d kasutati qPCR-is. *Ahr*-i transkripti koguste mõõtmiseks kasutati praimereid *AHR_mRNA_F/R*, normaliseerimiseks praimereid *GAPDH_mRNA_F/R* (vt Tabel 3). Suhtelised mRNA taseme muutused on kujutatud joonisel 6.

Tulemustest ilmnes, et PMSG mõjul suureneb granuloosarakkudes *Ahr*-i ekspressioon rohkem kui 2 korda ja PBS-iga süstitud hiirtes vastavas ajapunktis transkripti tase ei muutu. Üllataval kombel näeme FSH mõjul siiski statistiliselt olulist *Ahr*-i ekspressiooni suurenemist, kuigi *Ahr*-i valgu tase FSH mõjul märkimisväärselt ei muutunud. Kuna erinevalt PMSG-st puudub FSH-l võime aktiveerida LH retseptoreid, võiks see viidata LH vajalikkusele *Ahr*-i translatsioonilises regulatsioonis.

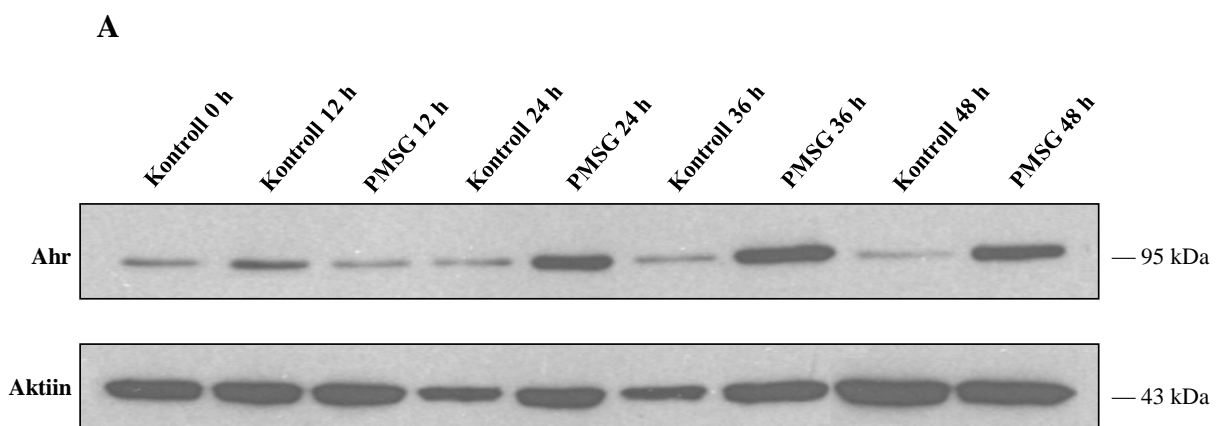
Saadud andmetest selgus, et luteiniseeriva hormooni süstimine hiirtele *Ahr*-i transkripti hulgale mõju ei avaldanud. Kuigi LH aktiivsus on munasarja folliikulite küpsemisel oluline, kinnitab katse, et nimetatud hormoonist üksi *Ahr*-i transkriptsiooni muutmiseks siiski ei piisa. Katsest järeldub, et olulisemaks hormooniks *Ahr*-i ülesregulatsioonil on FSH, mis seletab ka PMSG (omades peamiselt FSH-aktiivsust) tugevamat mõju *Ahr*-ile. Et aga LH-aktiivsus tundub olevat siiski vajalik *Ahr*-i valgu sünteesiks, otsustati edasistes katsetes *Ahr*-i ekspressiooni uurimisel enamasti kasutada siiski PMSG-d.

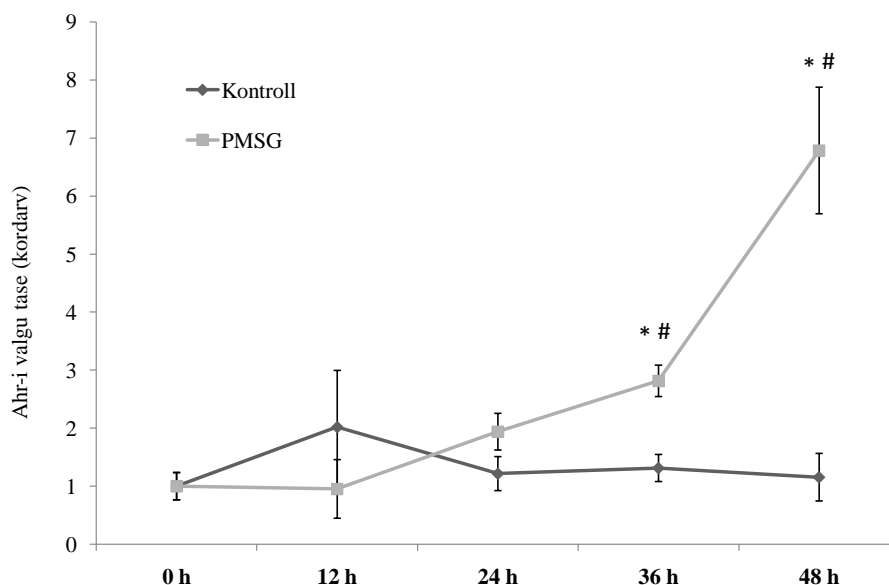


Joonis 6. FSH/PMSG/LH mõju *Ahr*-i mRNA tasemele *in vivo*. FSH ja PMSG puhul märgati *Ahr*-i ekspressiooni tõusu 48 h pärast hiirte süstimist. LH *Ahr*-i ekspressioonitaset ei mõjutanud. Erinevad tähed tulpade kohal tähendavad statistiliselt olulist erinevust ($p < 0,05$).

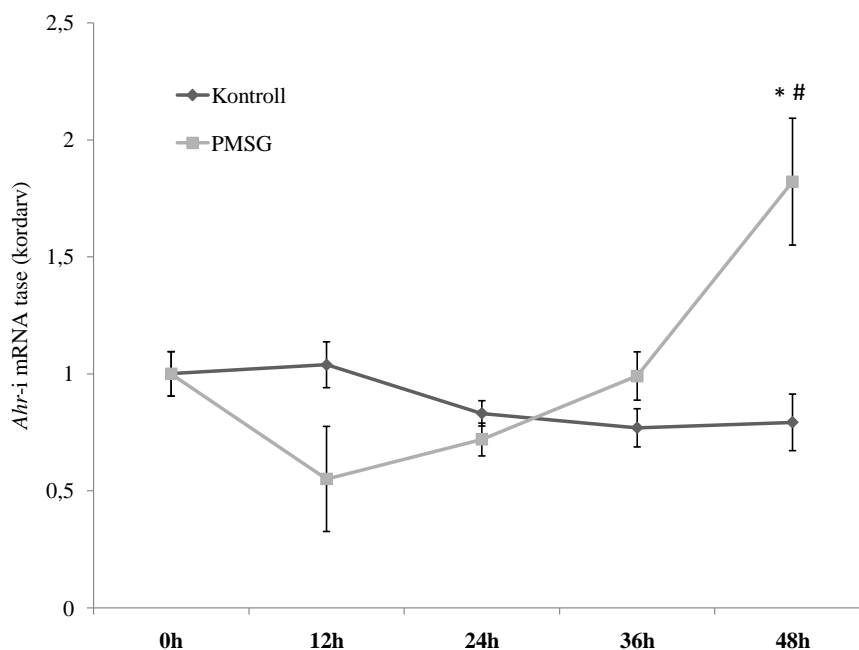
2.3.3. *Ahr*-i ekspressiooni dünaamika *in vivo*

Siiani nägime, et PMSG muudab hiire granuloosarakkudes 48 tundi pärast hormooni süstimist ehk folliikulite küpsemisel kuni preovulatoorse faasini arüüsüsivesinike retseptori hulka nii mRNA kui ka valgu tasemel. Täpsemate mehhanismide uurimise seisukohalt on aga oluline teada saada, mis hetkest alates need muutused toimuva hakkavad. Järgnevalt teostati katse, kus kontrolliks hukati 21-23 päeva vanused hiired (Kontroll 0h) või süstiti PBS-iga, hormooni mõju uurimiseks süstiti hiiri 5 RÜ PMSG-ga. Iga 12 tunni möödudes loomad hukati. Munasarjadest eraldati granuloosarakud, mis lüüsi ning teostati *Western blot*. Joonisel 7 A on näha, et hormooni mõjul muutub *Ahr*-i valgu 24 tundi pärast süstimist. See-eest statistiliselt oluliseks muutus on täheldatav 36 tunni möödudes (vt Joonis 7 B).



B

Joonis 7. PMSG mõju Ahr-i valgu dünaamikale *in vivo*. **A.** *Western blot*il täheldati PMSG mõju Ahr-i valgu taseme tõusule alates 24 h möödumisest. **B.** *Western blot*ide densitomeetria analüüs osundas Ahr-i valgu taseme keskmiselt 3-kordsele tõusule 36 h möödudes ja keskmiselt 7-kordsele tõusule 48 h möödudes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,01$ vs. 0h; # $p < 0,01$ vs. Kontroll).

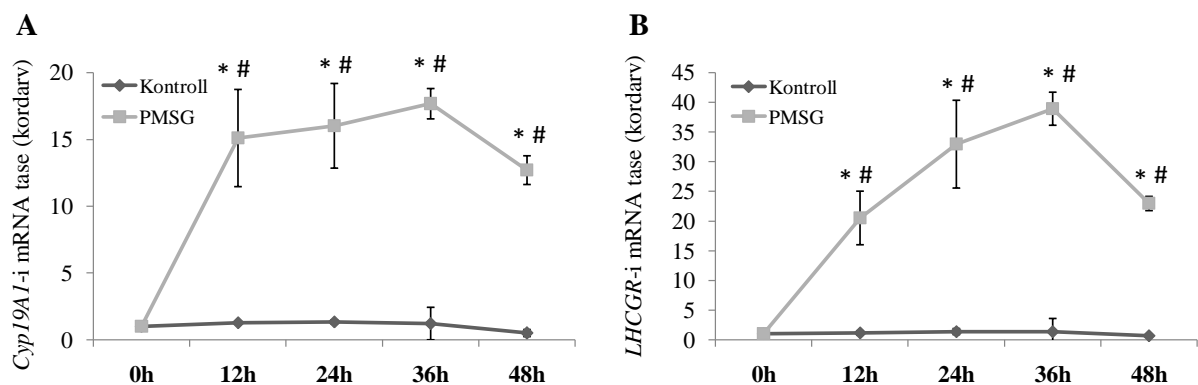


Joonis 8. PMSG mõju Ahr-i ekspressiooni dünaamikale *in vivo*. Hormooni mõjul ilmneb mRNA taseme langus 12 h möödudes, mis pöördub 24 h juures. Statistiliselt oluline mRNA taseme suurenemine avaldub 48 tunni möödudes. Tulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,01$ vs. 0h; # $p < 0,05$ vs. Kontroll).

Sarnaselt valgu taseme dünaamika kirjeldamisele teostati katse ka *Ahr*-i mRNA dünaamika uurimiseks. Eksperimendi ülesehitus oli sama – iga 12 tunni järel 48 tunni jooksul pärast

PMSG süstimist eraldati munasarjadest granuloosarakud ning lüüsi need. Rakkudest eraldati aga RNA, mida töödeldi DNAasiga, sünteesiti cDNA ning teostati qPCR. Saadud tulemused on esitatud joonisel 8. PMSG-l näib 12 tunni möödudes olevat *Ahr*-i avaldumisele represseeriv mõju (statistiline olulisus siiski puudub). 24 tunni möödudes see pöördub ning geeniekspressioon hakkab suurenema. Statistiliselt oluline vahe mRNA tasemes võrrelduna nii null-ajapunkti ($p < 0,01$) kui ka kontrolliks PBS-iga süstitud hiirte vastava ajapunktiga ($p < 0,05$) avaldub siiski alles 48 tundi pärast süstimist.

On teada, et folliikulite küpsemisega kaasneb granuloosarakkude diferentseerumine ning viimase protsessi käigus suureneb granuloosarakkudes aromataasi ning LH retseptorite ekspressioon. Nimetatud geenide ekspressioonitaseme muutuste järgi on vastupidiselt võimalik hinnata folliikulite küpsemist, mistõttu on nii aromataas (*Cyp19A1*) kui ka LH retseptor (*Lhcgr*) folliikulite küpsemise hindamisel sageli ka positiivseks indikaatoriks. PMSG toime avaldumise ja folliikulite küpsemise kontrollina määrasime 48 tunni jooksul aromataasi ning LH retseptori mRNA suhtelised tasemed. Selleks kasutati eelnevalt *Ahr*-i ekspressiooni dünaamika uurimisel eraldatud RNA-sid ning geeniekspressioon määrati CYP19A1_mRNA_F/R ja LHCGR_mRNA_F/R praimeritega (vt Tabel 3).



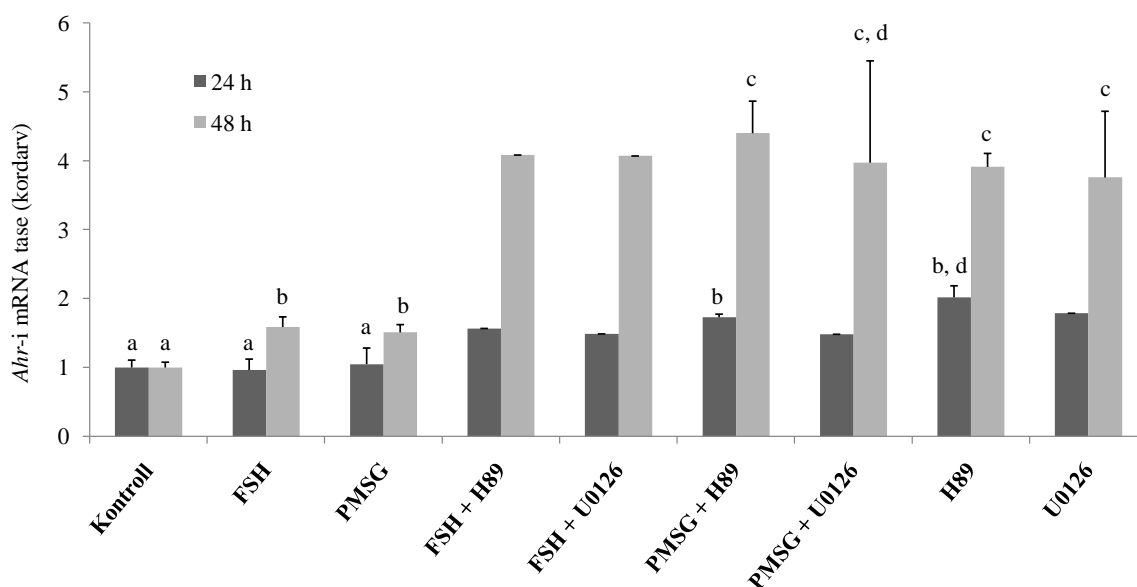
Joonis 9. PMSG mõju folliikuli küpsemise markergeenidele *in vivo*. **A.** PMSG mõjul täheldati aromataasi (*Cyp19A1*) ekspressiooni keskmiselt 15-kordset suurenemist juba 12 tunni möödudes. **B.** PMSG mõjul täheldati LH retseptori (*Lhcgr*) ekspressiooni keskmiselt 20-kordset tõusu 12 h möödudes ning veelgi suuremat edaspidist tõusu. Tulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,01$ vs. 0h; # $p < 0,01$ vs. Kontroll).

Joonisel 9 kujutatud katse tulemustest selgus, et mõlema markeri ekspressioonitase on väga kõrge juba alates 12. tunnist pärast PMSG süstimist ($p < 0,01$), mis tähendab, et töös uuritud granuloosarakud vastusena hormoonile diferentseeruvad, st. toimub folliikuli küpsemine.

Eksperimendi tulemused annavad kinnitust, et *Ahr*-i uurimine toimub õiges taustsüsteemis, see asjaolu on aga kriitiline *Ahr*-i ekspressiooni tõusule füsioloogilise tähenduse andmisel.

2.3.4. PKA ja ERK-i signaalirajad *Ahr*-i regulatsioonis *in vitro*

Eelnevalt leidsime, et PMSG suurendab *Ahr*-i ekspressiooni hiire granuloosarakkudes. Seni tehtud katsed ei anna siiski informatsiooni selle kohta, kuidas hormooni toime täpselt avaldub. Mehhanismide täpsemaks selgitamiseks uurisime kõigepealt, milliste signaalradade kaudu võiks FSH/PMSG *Ahr*-i taset muuta. Toetudes varasemalt avaldatud töödele, mis kirjeldavad PKA ning ERK kinaasiradade olulisust folliikulite küpsemisel, otsustasime uurida just nende radade võimalikku olulisust FSH/PMSG-st sõltuvas *Ahr*-i regulatsioonis. Selleks kasutasime PKA inhibiitorit H89 ning ERK-i inhibiitorit U0126.



Joonis 10. PKA ning ERK signaalirajad FSH/PMSG-st sõltuvas *Ahr*-i regulatsioonis *in vitro*. FSH ja PMSG mõjul suureneb *Ahr*-i mRNA tase alles 48 tunni möödudes. PKA ning ERK-i inhibiitori mõjul täheldati *Ahr*-i ekspressioonitaseme tõusu nii 24 kui ka 48 h möödudes. Katsed on teostatud 1-3 kordusena. Erinevad tähed tulpade kohal tähendavad statistiliselt olulist erinevust ($p < 0,05$).

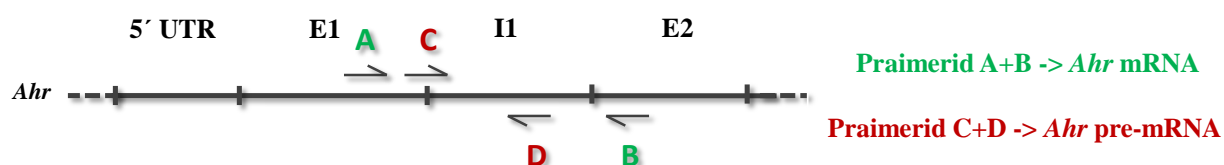
Eksperimendi läbiviimiseks külvati immatuursete hiirte munasarjadest eraldatud granuloosarakud koekultuuri tassidele 2,5 % seerumiga DMEM/Ham's F-12 söötmesse. Pärast rakkude kinnitumist ca 2 tundi hiljem vahetati seerumit sisaldav sööde seerumvaba söötme vastu ning lisati söötmesse PKA inhibiitor H89 (10 μ M) või ERK-I inhibitor U0126 (10 μ M). Veendumaks, et hormooni mõju avaldub kindlasti tingimustes, kus uuritava signaalraja toimimine on peatatud, inkubeeriti rakke inhibiitoritega 1 tunni jooksul enne

hormooni lisamist. Seejärel lisati kannudesse FSH ning PMSG (mõlemad 5 RÜ 1 ml söötme kohta) ning inkubeeriti 24 kuni 48 tundi. Vastava aja möödudes eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBS-iga ning lüüsi. Teostati DNAasi töötlus, pöördtranskriptsioon ning qPCR.

Tulemustest selgus, et FSH ja PMSG tõstavad *Ahr*-i mRNA taset rakkudes ka *in vitro* tingimustes (vt Joonis 10). Hormoonide mõju avaldub sealjuures 48 tundi pärast söötmesse lisamist ($p < 0,05$). Antud katsest ilmnes ka, et mõlemal inhibiitoril on positiivne mõju *Ahr*-i ekspressioonile ning FSH ega PMSG mingit lisaefekti sealjuures ei omanud. See viitab asjaolule, et *Ahr* võib olla konstitutiivselt repressseeritud nii PKA kui ka ERK signaalradade kaudu.

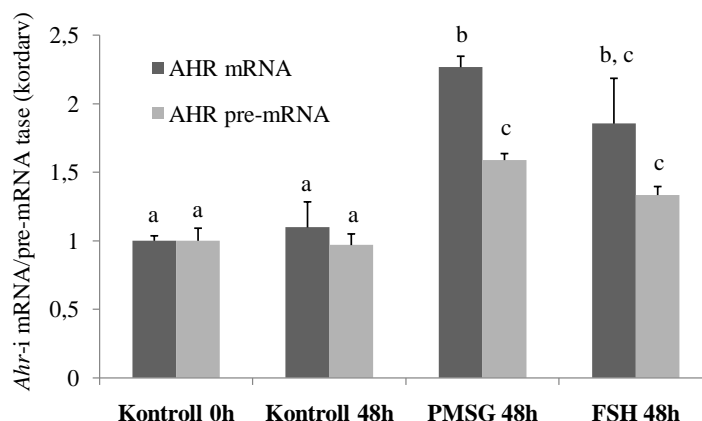
2.3.5. *Ahr*-i PMSG-st sõltuv transkriptsiooni määr *in vivo*

mRNA taset rakkudes võidakse reguleerida sünteesi aktiivsuse muutmise ja/või RNA stabiliseerimise/degradeerimise kaudu. Käesoleva töö käigus pidasime muuhulgas vajalikuks välja selgitada, millisel viisil tõuseb granuloosarakkudes *Ahr*-i transkripti tase. Uurimaks, kas see võiks toimuda sünteesi suurenemise kaudu, mõõtsime hormoonist sõltuvat transkriptsiooni määra.



Joonis 11. Katses kasutatud praimerite seondumiskohad *Ahr*-i geenijärjestusel. mRNA taseme mõõtmisel kasutati primereid A ja B, mis seonduvad esimese eksoni (E1) lõppu ja teise eksoni (E2) algusesse, pre-mRNA mõõtmiseks kasutati primereid C ja D, mis seonduvad esimese eksoni ja esimese introni piirile ning esimesele intronile (I1).

Katses kasutati 21-23 päeva vanused hiiri, kes hukati koheselt või süstiti PBS-i, 5 RÜ FSH või PMSG-ga. 48 tundi hiljem mõõdeti qPCR-i teel suhtelised ekspressioonitasemed. mRNA taseme määramiseks kasutati primereid, mis seondusid *Ahr*-i geenijärjestuse esimese eksoni lõppu ning teise eksoni algusesse. Pre-mRNA taseme mõõtmiseks kasutatud *forward* praimer AHR_pre-mRNA_E1-I1_F asub esimese eksoni ning esimese introni piiril, *reverse* praimer AHR_pre-mRNA_E1-I1_R asub esimeses intronis (vt Joonis 11 ja Tabel 3). Viimati nimetatud primereid kasutades saab mõõta transkripti hulka enne splaissingu toimumist. mRNA ja pre-mRNA kogused on normaliseeritud *Gapdh* suhtes.

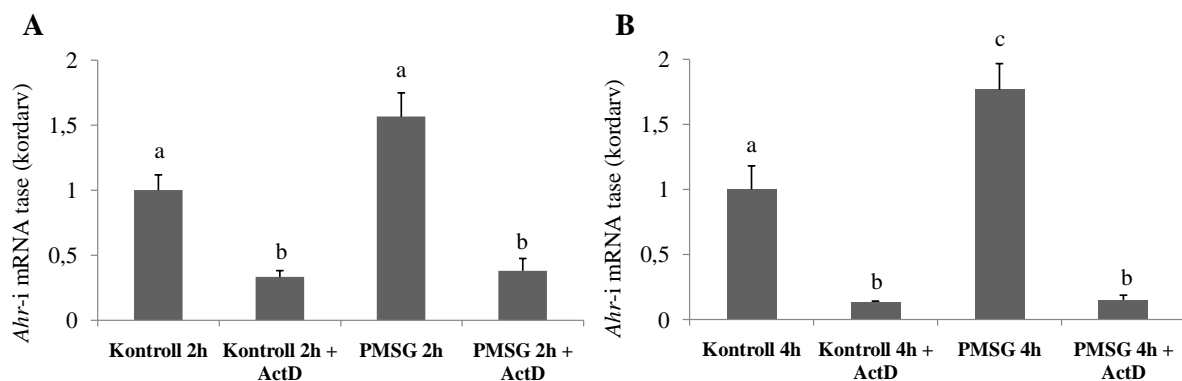


Joonis 12. PMSG ja FSH mõju *Ahr*-i transkriptsiooni määrale *in vivo*. Nii PMSG kui ka FSH puhul täheldati granuloosarakkudes *Ahr*-i transkriptsiooni määra suurenemist 48 h möödudes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel. Erinevad tähed tulpade kohal tähendavad statistiliselt olulist erinevust ($p < 0,05$).

Joonisel 12 kujutatud tulemustest selgus, et nii FSH kui ka PMSG tõstavad rakkudes lisaks *Ahr*-i mRNA tasemele ka *Ahr*-i pre-mRNA taset ($p < 0,05$). Sellest järeldub, et geeni ülesregulatsioon toimub transkripti sünteesi aktiivsuse suurendamise kaudu. Tulemustest näeme, et mRNA suhtelised muutused (kontroll 48 h vs PMSG/FSH 48 h) on võrreldes pre-mRNA suhteliste muutustega (kontroll 48 h vs PMSG/FSH 48 h) suuremad. Suurem mRNA taseme muutus võib tuleneda mRNA pikemast elueast rakkudes, kuid võib olla seletatav ka hormoonist tingitud stabiliseeriva toimega.

2.3.6. PMSG mõju *Ahr*-i mRNA stabiilsusele *in vitro*

Eelnevas etapis tehtud eksperimendi käigus selgus, et hormooni mõjul suureneb *Ahr*-i transkriptsiooni aktiivsus. Et teha kindlaks, kas ülesregulatsioon toimub vaid sünteesi suurendamise või lisaks ka mRNA stabiilsuse kaudu, viidi läbi katse, kus rakkudes peatati transkriptsioon ning mõõdeti mRNA tasemed hormooni poolt mõjutamata ning mõjutatud rakkudes. Transkriptsiooni peatamisel kasutati kemikaali aktinomütsiin D (ActD), mis moodustab kaheaahelalise DNA-ga seondudes stabiilse kompleksi ning takistab seeläbi RNA sünteesi. Eksperiment viidi läbi *in vitro* tingimustes, kuid veendumaks, et hormooni positiivne mõju *Ahr*-i transkriptsioonile on olemas, süstiti hiiri hormooniga (või kontrolliks PBS-iga) 48 tundi enne rakkude eraldamist ning koekultuuri tassile külvamist. Rakud külvati 2,5 % seerumi sisaldusega DMEM/Ham's F-12 söötmesse. Pärast rakkude kinnitumist tassile vahetati seerumiga sööde seerumvaba söötme vastu ning lisati ActD ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). 2 ja 4 tundi hiljem lüüsi rakud, eraldati RNA, teostati DNAasi töötlus, cDNA süntees ning qPCR.

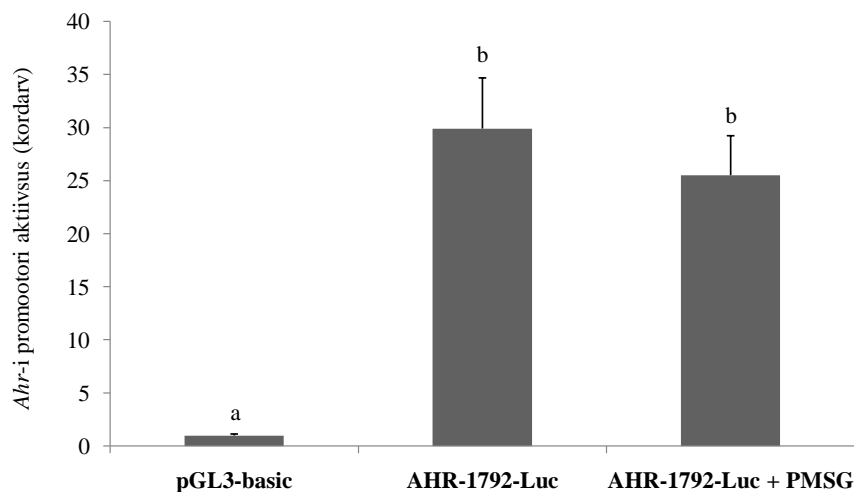


Joonis 13. PMSG mõju hindamine *Ahr*-i mRNA stabiilsusele *in vitro*. **A.** 2 tundi pärast ActD lisamist söötmesse ei märgatud *Ahr*-i mRNA taseme suurenemist PMSG mõjul. **B.** 4 tundi pärast ActD lisamist söötmesse ei märgatud *Ahr*-i mRNA taseme suurenemist PMSG mõjul. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel. Erinevad tähed tulpade kohal tähendavad statistiliselt olulist erinevust ($p < 0,05$).

Tulemusi analüüsides selgus, et antud katseskeemi puhul avaldub PMSG *Ahr*-i mRNA taset suurendav mõju nagu varasemalt täheldasime, samuti ilmnes aktinomütsiini transkriptsiooni takistav toime (vt Joonis 13). Täheldasime, et ActD lisamisel ei muuda PMSG *Ahr*-i mRNA taset ei 2h (vt Joonis 13 A) ega ka 4h (vt Joonis 13 B) puhul võrreldes kontrolliga ($p < 0,05$). See viitas asjaolule, et hormoonist sõltuv *Ahr*-i ekspressiooni suurenemine rakkudes ei toimu selle mRNA-d stabiliseeriva toime kaudu.

2.3.7. PMSG mõju *Ahr*-i promootorala sisaldavalt reportervektorile *in vitro*

Ahr-i ekspressioonimehhanismide edasisel kirjeldamisel pidasime vajalikuks tuvastada, kas PMSG-l on mõju *Ahr*-i promootorala aktiivsusele. Selleks külvasime immatuurse hiire munasarjadest eraldatud primaarsed granuloosarakud koekultuuri tassile ning transfekteerisime neid *Ahr*-i promootorala sisaldava reportervektoriga. Pärast transfektsiooni mõjutati rakke PMSG-ga 48 tunni jooksul, misjärel lüüsi rakud ning mõõdeti reportergeeni lutsiferaasi väärtused.

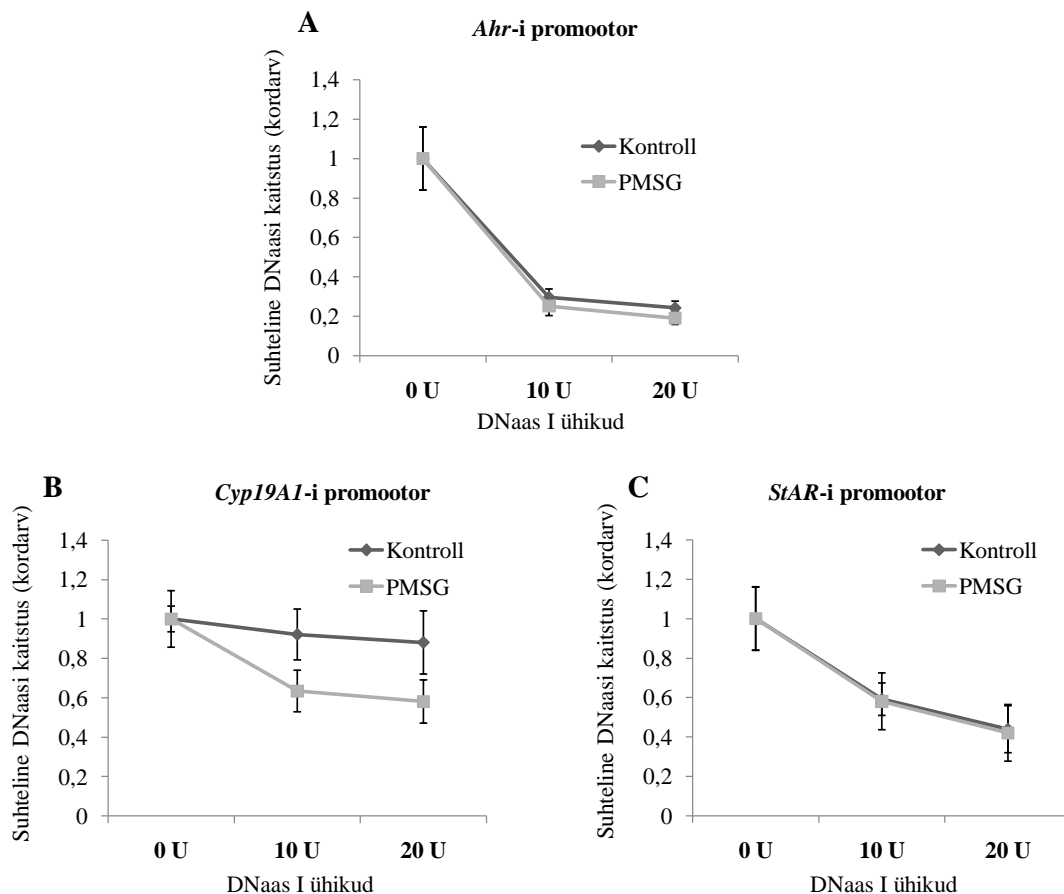


Joonis 14. PMSG mõju *Ahr*-i reportergeenile. PMSG mõjul ei täheldatud mõju *Ahr*-i 1792-aluspaarilist promootorala sisaldavale reportervektorile. Joonisel on kujutatud lutsiferaasi suhtelised väärtused tühja vektori suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel. Ühesugused tähed tulpade kohal tähendavad statistiliselt ebaolulist erinevust ($p > 0,05$).

Katse tulemusena saadud andmetest (vt Joonis 14) näib, et PMSG-l puudub mõju uuritava geeni promootorjärjestusele. Kuigi katse viidi läbi standardsel reportergeeni aktiivsuse uurimise meetodil, näis β -galaktosidaasi väärtusi analüüsides, et transfektsiooni efektiivsus on suhteliselt madal. Transfektsiooni efektiivsuse täpsemaks hindamiseks teostati kõrvalkatse, mille käigus transfekteeeriti rakke fluorestseeruvat valku sünteesiva plasmiidiga ning hinnati plasmidi sisaldavate rakkude osahulka kogu rakupopulatsioonist. Transfekteeerimisel katsetati erinevaid reagendi kontsentratsioone nii Turbofecti kui ka Reagent 007 puhul, kuid transfekteeerunud rakke oli siiski ainult ligikaudu 10% (andmeid ei esitata).

2.3.8. *Ahr*-i ekspressiooni sõltuvus kromatiini struktuurist *Ahr*-i promootorala piirkonnas *in vivo*

Kuna PMSG mõju reportergeeni aktiivsusele ei tuvastatud, uurisime, kas hormooni mõju *Ahr*-i ekspressioonile võiks avalduda läbi kromatiini pakituse muutmise. Katses süstiti immatuursetele hiirtele 5 RÜ PMSG-d või kontrolliks PBS-i. 48 tundi pärast süstimist eraldati hiirtest munasarjad, neist granuloosarakud ning viimastest omakorda rakutuomad. Tuumasid töödeldi erineva koguse DNAasiga, pärast mida puhastati genoomne DNA ning teostati qPCR. Huvipakkuvate geenide promootoralaade suhtelist kaitstust nukleaasi eest hinnati qPCR-i tulemusena amplifitseeritud DNA koguste põhjal.



Joonis 15. PMSG mõju DNase I ligipääsetavusele *Ahr*-i, *Cyp19A1* ja *Lhcgr*-i promootoralal *in vivo*. **A.** PMSG mõjul ei muutu DNAasi ligipääsetavus ja seetõttu kromatiini struktuur *Ahr*-i promootoralal. **B.** PMSG-l on täheldatav mõningane, kuid statistiliselt ebaoluline muutus DNAasi ligipääsetavuses ja seetõttu kromatiini struktuuris *Cyp19A1* promootoralal. **C.** PMSG mõjul ei muutu DNAasi ligipääsetavus ja seetõttu kromatiini struktuur *StAR*-i promootoralal. Kõik väärtused on normaliseeritud *PAX7* promootori suhtes. Tulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel. Kõik muutused DNAasi ligipääsetavuses (Kontroll vs. PMSG) on statistiliselt ebaolulised ($p > 0,05$).

Ahr-i promootorala uurimiseks kasutati primereid *AHR_promootor_F/R*, *Cyp19A1* promootori uurimiseks primereid *CYP19A1_promootor_F/R* ning *StAR* promootori uurimiseks primereid *StAR_promootor_F/R* (vt Tabel 3). Tulemuste normaliseerimiseks valiti referentsgeen, mille kromatiini struktuur promootorala piirkonnas on kompaktne. CHART-PCR-is on sellise referentsina varasemalt kasutatud geeni *PAX7* (Cruickshank jt, 2008). Kõik qPCR-is saadud väärtused on seetõttu normaliseeritud *PAX7* promootorala suhtes, kasutades primereid *PAX7_promootor_F/R* (vt Tabel 3).

Joonisel 15 on näidatud uuritud promootorala suhteline kaitstus DNAasi eest PBS-iga või PMSG-ga mõjutatud hiirtest eraldatud granuloosarakkudes 48 tundi pärast süstimist. Ilmnes, et PMSG-ga süstitud hiirte granuloosarakkudes PBS-iga võrreldes kromatiini struktuur *Ahr*-i

promootorala piirkonnas olulisel määral ei muutu (vt Joonis 15 A), millele viitab ühtlane nukleaasi DNA-d lagundav toime uuritavas piirkonnas.

Metoodika tõhususe hindamiseks kasutati kontrollina *Cyp19A1* ning *StAR*-i geenide promootoreid. Kuna on näidatud *Cyp19A1* ekspressiooni regulatsiooni kromatiini pakituse kaudu vastusena LH-le (Lee jt, 2013) ja on teada, et PMSG suurendab granuloosarakkudes märgatavalt *Cyp19A1* ekspressioonitaset (vt Joonis 9 A), eeldasime, et PMSG mõjul väheneb selle geeni promootorala kromatiini pakitus. *Cyp19A1* promootorala kaitstus DNAasi eest tundub PMSG mõjul vähenevat, mis viitab PMSG-st tingitud kromatiini kondensatsiooni vähenemisele selles piirkonnas (vt Joonis 15 B). Muutused pole siiski statistiliselt olulised ($p > 0,05$). Negatiivse kontrollina kasutatud *StAR* geeni promootori piirkonnas ei muutu PMSG toimel DNAasi ligipääsetavus ja seega ka kromatiini pakitus (vt Joonis 15 C).

2.4. Arutelu

Viimastel aastakümnetel on üha enam kinnitust leidnud fakt, et arüüsüsivesinike retseptoril on reproduktiivsüsteemis fundamentaalne tähtsus. *Ahr*-i *knockout* hiirtel on näidatud vähenenud ovulatsioonivõimet ning folliikulite aeglasemat kasvu (Hernandez-Ochoa jt, 2010). *Knockout* hiirte vähenenud viljakus tuleneb väiksemast gonadotropiinide retseptorite arvust munarakku ümbritsevas tugirakkudes, samuti esineb neis hiirtes häireid steroidogeneesis. Kinnitust on leidnud *Ahr*-i tähtsus aromataasi – follikulogeneesis olulist steroidhormooni östradiooli sünteesiva ensüümi – regulatsioonis (Baba jt, 2005). Mõistmaks *Ahr*-i täpset funktsiooni reproduktsioonis, on tähtis uurida, milliste mehhanismide kaudu toimub *Ahr*-i enda regulatsioon.

Munasarja folliikulite arengut koordineerivad gonadotropiinid FSH ning LH, mille tase ning funktsioon organismis on rangelt reguleeritud. Tulenevalt sellest on olnud põhjust uurida nende hormoonide mõju ka *Ahr*-ile. Kuigi praeguseks on ilmunud mõningaid andmeid gonadotropiinide mõjust *Ahr*-i ekspressioonile, pole täpsete mehhanismide kohta kuigi palju teada. Oleme oma laboris varasemalt näidanud, et hiire preovulatoorses granuloosarakkudes toimub vastusena LH-le *Ahr*-i allaregulatsioon PKA aktivatsiooni kaudu ning repressiooniks pole vajalik *de novo* valgusüntees. Tõestust leidis ka *Ahr*-i repressioon sünteesi vähenemise, mitte mRNA degradatsiooni kaudu. Avastasime, et ekspressiooni vähenemine toimus läbi kromatiini struktuursete muudatuste (Teino jt, 2014). Kui varasemalt uurisime *Ahr*-i ekspressiooni follikulogeneesi preovulatoorses faasis vastusena luteiniseerivale hormoonile,

siis käesolevas magistritöös on keskendutud *Ahr*-i regulatsioonimehhanismide selgitamisele folliikulite küpsemise faasis.

Ahr-i regulatsiooni vastusena FSH-le pole uuritud peaaegu mitte üldse. Bussmann ja Baranao (2006) näitasid, et roti granuloosarakkudes toimub vastusena FSH-le *Ahr*-i allaregulatsioon. Eksperimendid olid aga läbi viidud *in vitro* ning ei kajasta füsioloogilist olukorda. Käesolevas töös uuriti FSH või sellele analoogse hormooni PMSG mõju *Ahr*-ile *in vivo*. Huvi pakkus välja selgitada, kas gonadotropiini toime muutub rakkudes *Ahr*-i valgu ja mRNA tase ning sealjuures kirjeldada muutustes osalevaid molekulaarseid mehhanisme.

Geenide võime rakulisi protsesse reguleerida toimub enamasti valkude vahendusel. Kuna *Ahr*-i puudumisel on näidatud häireid follikulogeneesis (Barnett jt, 2007b), võis eeldada gonadotropiinide olulisust ka *Ahr*-i regulatsioonis. Nägime, et valgu kogus PMSG mõjul suurenes. Üllataval kombel selgus, et FSH kui uuritavas folliikuli arengufaasis osalev võtmehormoon *Ahr*-i valgu taset ei tõstnud. Sellist nähtust võiks seletada tõsiasjaga, et kuigi PMSG-l on esmajoonel siiski FSH-aktiivsus (González-Menció jt, 1978), on hormoonil teadaolevalt võime aktiveerida ka LH retseptoreid (Combarnous jt, 1984). Viimast asjaolu arvestades võib oletada, et *Ahr*-i valgu taseme tõusuks on lisaks FSH-le vajalik ka LH mõju.

Kuna PMSG mõjul suurenes uuritavates rakkudes *Ahr*-i valgu tase, oli põhjust arvata, et hormooni mõjul suureneb ka mRNA ekspressioon. Nagu eeldatud, nägime PMSG mõjul olulist kasvu *Ahr*-i mRNA tasemes. Eksperimendi andmetest selgus, et *Ahr*-i transkriptsioon suurenes olulisel määral ka FSH toime. FSH mõju *Ahr*-i transkripti kasvule, kuid mitte valgu taseme tõusule võib tähendada, et valgu sünteesiks potentsiaalselt oluline LH aktiivsus PMSG-l avaldub *Ahr*-i post-transkriptsioonilisel tasemel.

Uurimaks seda, kas PMSG-st sõltuv *Ahr*-i regulatsioon võiks tuleneda üksnes hormoonile omasest LH aktiivsusest, süstisime hiiri ka ainult LH-ga. Selgus, et LH-st üksi *Ahr*-i mRNA taseme tõusuks ei piisanud. Andmed annavad kinnitust, et FSH on folliikulite küpsemisega kaasnevas *Ahr*-i ülesregulatsioonis siiski võtmehormoon, kuid *Ahr*-i valgu sünteesiks on sellegipoolest vajalik mõlema gonadotropiini koosmõju. Nimetatud põhjusel otsustati käesolevas töös *Ahr*-i regulatsiooni uurimiseks kasutada enamasti PMSG-d.

Ekspressioonimehhanismide kirjeldamisel pidasime vajalikuks uurida, mis hetkest avaldub PMSG mõju *Ahr*-i taseme tõusule. Selgus, et olulisel määral oli *Ahr*-i valgu kogus rakkudes tõusnud alates 36 tunnist pärast süstimist. Kuna ülesregulatsioon on ajaliselt hiline, võib arvata, et PMSG mõju *Ahr*-ile on kaudne, st mõne teise geeni ekspressiooni kaudu. Huvitav nähtus ilmnes ka järgmisest katsest, kus mõõdeti sarnaselt valgule ka *Ahr*-i ekspressioonitaset.

Eeldus, et mRNA tase rakkudes tõuseb enne valgu taset, paika ei pidanud. Veelgi enam, *Ahr*-i ülesregulatsioon transkripti tasemel avaldus statistiliselt olulisel määral alles 48 tundi pärast PMSG süstimist. Kuigi andmed näivad esmajoones vastuolulised, on leitud, et mRNA tase rakkudes korreleerub sellelt mRNA-lt sünteesitava valgu tasemega vähem kui 50 % juhtudest (Schwanhaussier jt, 2011). Ekspressiooni dünaamika katsetes nähtud nihe mRNA ja valgu tasemete vahel võib seega olla seletatav post-transkriptsiooniliste mehhanismide kaudu, sealjuures translatsiooni efektiivsuse või valgu stabiliseerimise kaudu. Schwanhaussier jt. (2011) näitasid, et enamasti ei kontrollita valkude taset rakkudes siiski valkude stabiilsuse kaudu – parimaks indikaatoriks valgu tasemele on translatsiooniline aktiivsus, mis on ühtlasi loogiline ka energeetilisest aspektist. Hüpotees, mille kohaselt *Ahr*-i ülesregulatsiooni PMSG toimel kontrollitakse osaliselt translatsioonilisel tasemel, seletaks antud katses saadeid tulemusi. Lisaks viitaks see omakorda võimalusele, et eelnevalt nähtud PMSG, kuid mitte FSH mõju *Ahr*-i valgu taseme suurenemisele on tingitud PMSG LH aktiivsuse vajalikkusest *Ahr*-i translatsiooniks.

Lisaks translatsioonilisele aktiivsusele ja valkude stabiilsusele võib geeniekspressiooni regulatsioon rakkudes toimuda ka transkriptsiooni aktiivsuse või mRNA stabiilsuse kaudu. Kuna nägime, et PMSG mõjul suureneb granuloosarakkudes *Ahr*-i mRNA tase, pidasime vajalikuks uurida, kas PMSG-st tingitud *Ahr*-i ülesregulatsioon toimub läbi mRNA sünteesi suurendamise ja/või mis määral võiks regulatsioonis tähtsust omada mRNA stabiilsus. Eksperimendis mõõtsime muutust *Ahr*-i pre-mRNA tasemes enne ning pärast hormooni süstimist ja võrdlesime seda muutusega mRNA tasemes. Pre-mRNA on väga lühikese poolelueaga transkriptsiooni esmane ja veel splaissimata produkt ning seega täpseks indikaatoriks transkriptsioonilise aktiivsuse määramisel. Töös nägime, et PMSG mõjul suurenes granuloosarakkudes *Ahr*-i pre-mRNA tase, mis kinnitab, et hormooni mõju *Ahr*-i ekspressioonile toimub läbi mRNA sünteesi suurendamise. Sellegipoolest, võrreldes pre-mRNA suhtelist muutust mRNA suhtelise muutusega hormooni mõjul, nägime, et mRNA tase tõusis rohkem. See võib tähendada, et PMSG-l on lisaks transkriptsiooni suurendamisele ka mRNA-d stabiliseeriv mõju. Viimase väite kontrollimiseks teostasime katse, milles peatasime rakkudes transkriptsiooni, kasutades kemikaali aktinomütsiini D, ning vaatlesime PMSG mõju *Ahr*-i mRNA kogusele. Kuigi PMSG tõstis *Ahr*-i mRNA taset ilma aktinomütsiini lisamiseta, ei näinud me, et PMSG mõjuks kuidagi aktinomütsiini lisamisest tingitud *Ahr*-i langusele. Teisisõnu, PMSG ei mõjuta *Ahr*-i transkripti kogust selle stabiliseerimise kaudu. Eelnevalt nähtud mRNA taseme suurem suhteline muutus võrreldes pre-mRNA-ga võib seega tuleneda lihtsalt mRNA pikemast poolelueast rakkudes. Oluline on siinkohal ka mainida, et mRNA

absoluutkogused mõõdetud ajahetkedel olid rakkudes alati märgatavalt suuremad pre-mRNA absoluutkogustest.

On näidatud, et FSH mõju folliikulites avaldub peamiselt läbi PKA signaliseerimise (Stocco, 2008). Veelgi enam, PKA kinaasiraja olulisus on tõestatud ka *Ahr*-i regulatsioonis vastusena LH-le (Teino jt, 2014). Tulenevalt sellest, otsustati uurida, kas antud kinaasirada on oluline *Ahr*-i PMSG-seoselises ülesregulatsioonis. Lisaks PKA rajale vaadeldi käesolevas töös ka ERK kinaasiraja tähtsust. Kasutades kinaaside inhibiitoreid, tuvastati mõlemal juhul märgatav suurenemine *Ahr*-i mRNA tasemes. Seega on *Ahr*-i transkriptsioon granuloosarakkudes alaliselt repressioneeritud ning see toimub läbi nimetatud signaaliradade. Katse tulemustest selgus teinegi huvitav tõsiasi – PMSG ei omanud lisaefekti inhibiitorite mõjule. See võib aga tähendada, et PMSG reguleerib *Ahr*-i ekspressiooni mingi teise signaaliraja kaudu. Samuti ei saa välistada mitme signaaliraja koosmõju. Sellele viitab ka hiljuti tekkinud arusaam, et konkreetse geeni regulatsiooniks sageli ühest signaalirajast ei piisa (Hunzicker-Dunn ja Maizels, 2006).

Üha enam leitakse tõendeid, et follikulogeneesis tähtsaid protsesse reguleeritakse epigeneetilisel tasemel. Teino jt. (2014) näitasid, et preovulatoorses folliikulis toimub kromatiini kokkupakkimise kaudu ka LH-seoseline *Ahr*-i repressioon. Ko jt. (2014) vihjasid *Ahr*-i võimaliku bivalentse promootori olemasolule, mida reguleeritakse kromatiini remodelleerivate valgukomplekside kaudu. Kuna on näidatud *Ahr*-i regulatsiooni võimalikkust epigeneetiliselt, otsustasime uurida, kas PMSG-sõltuv *Ahr*-i ülesregulatsioon küpseva folliikuli granuloosarakkudes võiks samuti toimuda kromatiini tasemel. Selleks kasutasime käesolevas töös CHART-PCR metoodikat, mis seisneb DNAasi ligipääsetavuse tuvastamisel uuritavale geenijärjestusele ja selle põhjal kromatiini koht-spetsiifilise struktuuri kohta järelduste tegemisel. Selgus, et PMSG ei mõjuta 48 tundi pärast hiirte süstimist olulisel määral DNAasi ligipääsetavust ning seega ka kromatiini pakitust *Ahr*-i promootoralal. Lisaks *Ahr*-ile vaatlesime PMSG mõju kromatiini struktuurile ka *Cyp19A1* ning *StAR* geenide promootoralas. Kuna varasemalt on näidatud nende geenide võimalikku regulatsiooni kromatiini kaudu (Nimz jt, 2010; Lee jt, 2013), käsitleti neid kahte geeni kui võimalikku positiivset ja negatiivset kontrolli, andmaks sealjuures hinnangut metoodika tõhususele. Lee jt (2013) näitasid, et preovulatoorses folliikulis toimub vastusena LH-le *Cyp19A1* repressioon kromatiini pakituse kaudu. Kuna on teada, et PMSG suurendab granuloosarakkudes märgatavalt *Cyp19A1* ekspressioonitaset (vt Joonis 9 A), eeldasime, et PMSG mõjul väheneb selle geeni promootoralas kromatiini pakitus. *Cyp19A1* promootorala puhul nägime PMSG kromatiini kondensatsiooni vähendavat tendentsi, mis küll statistiliselt oluline ei olnud. Kuigi

avatud kromatiin geeni piirkonnas viitab enamasti suuremale ekspressioonile ja *vice versa*, on praegu veel üsna ebaselge, millisel määral muutused kromatiini kondensatsioonis muutustega geeni ekspressioonis sarnanevad (Lee jt, 2013). *StAR*-i promootoralas PMSG mõjul muutusi kromatiini pakituses ei täheldatud. Selle geeni olulisus munasarjas väljendub eelkõige akuutse mRNA taseme tõusu näol preovulatoorses folliikulis, mitte folliikulite küpsemise faasis, mistõttu antud katses PMSG mõju *StAR*-i promootorile ka ei oodatud.

Ahr-i ekspressioonitase võib PMSG mõjul suureneda promootori aktiivsuse või kromatiini pakituse kaudu. Kuna hormooni mõju *Ahr*-i promootorala kromatiini struktuurile puudus, jäi üle kontrollida, kas PMSG mõjutab uuritava geeni promootori aktiivsust. Selleks uurisime PMSG mõju *Ahr*-i promootorala sisaldavale reportergeenile. Tulemustest selgus, et PMSG ei mõjuta *Ahr*-i ekspressiooni promootorala aktiivsuse kaudu. Kõrvalkatsena tehtud analüüs näitas, et transfektsiooni efektiivsus primaarsetes granuloosarakkudes võib olla siiski ebapiisav, et kinnitada PMSG mõju puudumist *Ahr*-i promootorile.

FSH (või PMSG) mõju *Ahr*-i ekspressioonile granuloosarakkudes on väga vähe uuritud. Veelgi enam, hormooni mõju on uuritud ainult *in vitro* tingimustes (Bussmann ja Baranao, 2006). Käesoleva töö eesmärk oli hormoonist sõltuv *Ahr*-i ekspressiooni kirjeldamine võimalikult sarnastes tingimustes füsioloogilisele olukorrale munasarjas. On teada, et granuloosarakkude diferentseerumisega kaasneb aromataasi ning LH retseptori mRNA taseme tõus granuloosarakkudes, mistõttu kasutatakse neid markerina, hindamaks hormooni mõju avaldumist ning folliikuli küpsemist (Cannon jt, 2007). Hinnates PMSG mõju nimetatud markerite ekspressioonile, tuvastasime, et *Ahr*-i ekspressiooni uurimine toimub sobivas taustsüsteemis, st PMSG kutsub esile folliikulite küpsemise. Kuigi katse oli esmajoones teostatud kontrolliks, avastasime, et aromataasi mRNA tase tõuseb hiire granuloosarakkudes väga kõrgele juba 12 tundi pärast PMSG süstimist. Saadud tulemus on kooskõlas Cannoni jt. (2007) uuringuga, kus näidati PMSG mõju aromataasi ekspressioonile juba 24 tunni möödudes. Baba jt. (2005) on näidanud, et *Ahr* osaleb aromataasi ekspressiooni regulatsioonis. Käesolevas töös varasemalt nähtud *Ahr*-i valgu ning mRNA tunduvalt hilisem ülesregulatsioon võrreldes aromataasiga annab alust arvata, et FSH-st tingitud (st. indutseeritavas) aromataasi ekspressioonis *Ahr* ei osale. Siit järeldub, et *Ahr*-i ekspressiooni muutus pole aromataasi ekspressioonis kriitiline, st. *Ahr*-i funktsioon aromataasi regulatsioonis on konstitutiivne. Meie andmed on kooskõlas Hernandez-Ochoa jt. (2013) uuringuga, kus väidetakse, et *Ahr* ei pruugi vahendada FSH mõju steroidogeneesile. Lisaks pakuti eelnevas uuringus välja, et *Ahr* võib hoopis panustada FSH-st sõltuvale folliikulite

suurenemisele. Meie andmete põhjal pole ka välistatud, et Ahr-i olulisus aromataasi regulatsioonis võib avalduda juba enne folliikuli arengu FSH-sõltuvat faasi.

Kokkuvõtteks – käesolev töö on üks esimesi, kus on uuritud PMSG-st sõltuvat *Ahr*-i ekspressiooni hiire granuloosarakkudes folliikulite küpsemisel *in vivo*. Samuti selgitati täpsemalt molekulaarseid mehhanisme, mille kaudu *Ahr*-i regulatsioon toimub. Töös teostatud katsete tulemuste põhjal võib teha mitmeid olulisi järeldusi:

- 1) küpseva folliikuli granuloosarakkudes on Ahr-i ülesregulatsiooniks lisaks mRNAle ka valgu tasemel vajalik mõlema gonadotropiini, nii FSH kui ka LH, koostoime;
- 2) PMSG-st sõltuv Ahr-i ülesregulatsioon on osaliselt kontrollitud translatsioonilisel tasemel;
- 3) PMSG mõju Ahr-ile ei toimu kromatiini remodelleerimise kaudu;
- 4) Ahr ei osale FSH-indutseeritavas aromataasi ülesregulatsioonis, st. Ahr-i tähtsus aromataasi regulatsioonis on konstitutiivne.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida FSH (PMSG) mõju *Ahr*-i ekspressioonile hiire munasarja granuloosarakkudes folliikulite küpsemise staadiumis ja seletada, milliste mehhanismide kaudu ekspressiooni regulatsioon toimub.

Töö käigus tehtud eksperimentide käigus tuvastati, et folliikulite küpsemisel tõuseb hiire granuloosarakkudes *Ahr*-i valgu ning mRNA tase. Selgus, et mRNA ekspressioonis on tähtsaimal kohal FSH, kuid *Ahr*-i valgu sünteesiks on oluline FSH ning LH koostoime. Samuti viitavad saadud andmed *Ahr*-i translatsioonilisele regulatsioonile. Leidsime kinnitust, et PMSG suurendab *Ahr*-i mRNA taset transkriptsiooni aktiivsuse, mitte mRNA stabiilsuse kaudu. Signaaliradade olulisust uurides selgus, et PKA ja ERK-i inhibiitorid suurendavad *Ahr*-i ekspressiooni, kusjuures gonadotropiinid lisaefekti ei omanud. Lisaks tuvastati, et *Ahr*-i PMSG-toimeline ekspressiooni tõus ei toimu läbi kromatiini kondensatsiooni vähendamise, hormooni mõju *Ahr*-i promootori aktiivsusele vajab aga edasist uurimist. Avastati, et FSH-st indutseeritud aromataasi ekspressioon ei ole tingitud *Ahr*-i ülesregulatsioonist, mis tähendab, et *Ahr*-i mõju aromataasi ekspressiooni regulatsioonis on konstitutiivne.

Kuigi töö käigus avastati nii mõndagi uut *Ahr*-i regulatsiooni kohta, jäid mitmed asjaolud ka lahtiseks. Edaspidi vajaks täpsemat seletamist, milliste signaalradade kaudu FSH-st sõltuv *Ahr*-i ülesregulatsioon toimub. Kuna *Ahr*-i ekspressiooni suurenemine ei toimunud kromatiini tasemel, peaks täpsemalt edasi uurima hormooni mõju geeni promootorala aktiivsusele. Arvestades seda, et *Ahr*-i ekspressioon suureneb granuloosarakkude diferentseerumise hilisemas faasis ning ei osale FSH-st indutseeritud aromataasi ülesregulatsioonis, on edaspidi oluline täpsustada *Ahr*-i füsioloogilist funktsiooni folliikuli küpsemise käigus.

The studies on aryl hydrocarbon receptor expression mechanisms in murine granulosa cells

Antti Matvere

RESUMÉ

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor that is primarily known for its involvement in the metabolism of dioxin-like compounds. Although crucial for dioxin toxicity, recent studies have established the endogenous role of AHR, including its importance in female reproduction. Studies with *Ahr* *knockout* mice have demonstrated reduced gonadotropin responsiveness and slower ovarian follicle growth due to impaired estradiol production. Since *Ahr* has an important biological role in folliculogenesis, it is important to understand the mechanisms by which *Ahr* itself is regulated.

Previous studies on mice have mostly investigated the regulation of *Ahr* in preovulatory follicles in response to LH. However, there is very little data on how *Ahr* is regulated during follicle development. The current study focused on examining the regulation of *Ahr* in response to FSH including explaining the molecular mechanisms behind it.

We found that PMSG increases *Ahr* mRNA and protein levels. Also, FSH and LH activities are both necessary for the increase of *Ahr* protein. Our data indicate that PMSG augments *Ahr* protein levels via translational regulation. Furthermore, the late upregulation of *Ahr* expression in follicular maturation refers to an indirect action of PMSG on *Ahr* regulation. Surprisingly, PKA and ERK pathways seem to repress *Ahr* transcription constitutively and independently of PMSG influence. Also, our data suggest that PMSG increases *Ahr* mRNA levels via mRNA synthesis and not through mRNA stabilization. Furthermore, changes in chromatin condensation are not involved in the upregulation of *Ahr* in response to PMSG. Interestingly, we discovered that *Ahr* upregulation does not participate in FSH induced aromatase expression. Although aromatase is a well-known target for *Ahr*, these results suggest that FSH induced upregulation of *Ahr* may have other significance in follicle development.

In conclusion, the current study was one of the first to investigate *Ahr* regulation in response to FSH during follicle maturation. It is also a good platform for further experiments to elucidate the precise mechanisms behind the regulation of *Ahr* and clarify its importance in granulosa cells of maturing follicle.

Tänuavaldused

Avaldan erilist tänu oma juhendajatele Indrek Teinole ning Tarmo Tiidole, kes käesoleva magistritöö valmimisel suureks abiks olid. Samuti soovin tänada TÜ MRI rakubioloogia õppetooli sõbraliku ning mõnusa atmosfääri pakkumise eest!

Kasutatud kirjandus

- Baba T., Mimura J., Gradin K., Kuroiwa A., Watanabe T., Matsuda Y., Inazawa J., Sogawa K. ja Fujii-Kuriyama Y. (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *The Journal of biological chemistry* 276: 33101-33110
- Baba T., Mimura J., Nakamura N., Harada N., Yamamoto M., Morohashi K. ja Fujii-Kuriyama Y. (2005) Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Molecular and cellular biology* 25: 10040-10051
- Bao B. ja Garverick H. A. (1998) Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of animal science* 76: 1903-1921
- Barnett K. R., Tomic D., Gupta R. K., Babus J. K., Roby K. F., Terranova P. F. ja Flaws J. A. (2007a) The aryl hydrocarbon receptor is required for normal gonadotropin responsiveness in the mouse ovary. *Toxicology and applied pharmacology* 223: 66-72
- Barnett K. R., Tomic D., Gupta R. K., Miller K. P., Meachum S., Paulose T. ja Flaws J. A. (2007b) The aryl hydrocarbon receptor affects mouse ovarian follicle growth via mechanisms involving estradiol regulation and responsiveness. *Biology of reproduction* 76: 1062-1070
- Bekki K., Vogel H., Li W., Ito T., Sweeney C., Haarmann-Stemmann T., Matsumura F. and Vogel C.F. (2015) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates resistance to apoptosis induced in breast cancer cells. *Pestic Biochem Physiol*, 120 : 5-13.
- Belchetz P. E., Plant T. M., Nakai Y., Keogh E. J. ja Knobil E. (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202: 631-633
- Benedict J. C., Lin T. M., Loeffler I. K., Peterson R. E. ja Flaws J. A. (2000) Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 56: 382-388
- Berger S. L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407-412
- Bruhs A., Haarmann-Stemmann T., Frauenstein K., Krutmann J., Schwarz T. and Schwarz A. (2015) Activation of the arylhydrocarbon receptor causes immunosuppression primarily by modulating dendritic cells. *J Invest Dermatol* 135 : 435-444.
- Bussmann U. A. ja Baranao J. L. (2006) Regulation of aryl hydrocarbon receptor expression in rat granulosa cells. *Biology of reproduction* 75: 360-369
- Cannon J. D., Cherian-Shaw M., Lovekamp-Swan T. ja Chaffin C. L. (2007) Granulosa cell expression of G1/S phase cyclins and cyclin-dependent kinases in PMSG-induced follicle growth. *Molecular and cellular endocrinology* 264: 6-15
- Carletti M. Z. ja Christenson L. K. (2009) Rapid effects of LH on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reproduction* 137: 843-855
- Chaffin C. L., Stouffer R. L. ja Duffy D. M. (1999) Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in

- macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 140: 4753-4760
- Chaffin C. L., Trewin A. L. ja Hutz R. J. (2000) Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chemico-biological interactions* 124: 205-216
- Chang C.C., Sue Y.M., Yang N.J., Lee Y.H. and Juan S.H. (2014) 3-Methylcholanthrene, an AhR agonist, caused cell-cycle arrest by histone deacetylation through a RhoA-dependent recruitment of HDAC1 and pRb2 to E2F1 complex. *PLoS One*, 9 : e92793
- Chen Y. D., Shaw M. J. ja Payne A. H. (1977) Steroid and FSH action on LH receptors and LH-sensitive testicular responsiveness during sexual maturation of the rat. *Molecular and cellular endocrinology* 8: 291-299
- Cheng X. ja Blumenthal R. M. (2010) Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry* 49: 2999-3008
- Combarnous Y., Guillou F., Martinat N. and Cahoreau C. (1984) [Origin of the FSH + LH double activity of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG)]. *Ann Endocrinol (Paris)* 45 : 261-268.
- Crowley W. F., Jr., Filicori M., Spratt D. I. ja Santoro N. F. (1985) The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent progress in hormone research* 41: 473-531
- Cruickshank M., Fenwick E., Abraham L. J. ja Ulgiati D. (2008) Quantitative differences in chromatin accessibility across regulatory regions can be directly compared in distinct cell-types. *Biochemical and biophysical research communications* 367: 349-355
- Cuartero M.I., Ballesteros I., de la Parra J., Harkin A.L., Abautret-Daly A., Sherwin E., Fernandez Salguero P., Corbi A.L., Lizasoain I. and Moro M.A. (2014) L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation*, 130 : 2040-2051
- Cui Y. J., Yeager R. L., Zhong X. B. ja Klaassen C. D. (2009) Ontogenic expression of hepatic Ahr mRNA is associated with histone H3K4 di-methylation during mouse liver development. *Toxicology letters* 189: 184-190
- Denison M. S., Fisher J. M. ja Whitlock J. P., Jr. (1989) Protein-DNA interactions at recognition sites for the dioxin-Ah receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 264: 16478-16482
- Denison M. S. ja Nagy S. R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43: 309-334
- Donadeu F. X. ja Ascoli M. (2005) The differential effects of the gonadotropin receptors on aromatase expression in primary cultures of immature rat granulosa cells are highly dependent on the density of receptors expressed and the activation of the inositol phosphate cascade. *Endocrinology* 146: 3907-3916
- Drummond A. E. (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 4: 16

- Edson M. A., Nagaraja A. K. ja Matzuk M. M. (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews* 30: 624-712
- Elsaesser F., Parvizi N. ja Foxcroft G. (1998) Ovarian modulation of the oestradiol-induced LH surge in prepubertal and sexually mature gilts. *Journal of reproduction and fertility* 113: 1-8
- Epifano O. ja Dean J. (2002) Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13: 169-173
- Findlay J. K., Britt K., Kerr J. B., O'Donnell L., Jones M. E., Drummond A. E. ja Simpson E. R. (2001) The road to ovulation: the role of oestrogens. *Reproduction, fertility, and development* 13: 543-547
- Fisher C. R., Graves K. H., Parlow A. F. ja Simpson E. R. (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6965-6970
- Floreani M., De Martin S., Gabbia D., Barbierato M., Nassi A., Mescoli C., Orlando R., Bova S., Angeli P., Gola E., Sticca A. and Palatini P. (2013) Severe liver cirrhosis markedly reduces AhR-mediated induction of cytochrome P450 in rats by decreasing the transcription of target genes. *PLoS One*, 8 : e61983
- Garrison P. M. ja Denison M. S. (2000) Analysis of the murine AhR gene promoter. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 14: 1-10
- Garrison P. M., Rogers J. M., Brackney W. R. ja Denison M. S. (2000) Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter. *Archives of biochemistry and biophysics* 374: 161-171
- Ginsburg M., Snow M. H. ja McLaren A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528
- González-Menció F., Manns J. and Murphy B. (1978) FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Animal Reproduction Science* 1 : 137-144
- Gu Y. Z., Hogenesch J. B. ja Bradfield C. A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40: 519-561
- Hahn M. E. (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-biological interactions* 141: 131-160
- Hazum E. ja Conn P. M. (1988) Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The GnRH receptor. *Endocrine reviews* 9: 379-386
- Hernandez-Ochoa I., Karman B. N. ja Flaws J. A. (2009) The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system. *Biochemical pharmacology* 77: 547-559
- Hernandez-Ochoa I., Barnett-Ringgold K. R., Dehlinger S. L., Gupta R. K., Leslie T. C., Roby K. F. ja Flaws J. A. (2010) The ability of the aryl hydrocarbon receptor to regulate ovarian follicle growth and estradiol biosynthesis in mice depends on stage of sexual maturity. *Biology of reproduction* 83: 698-706
- Hernandez-Ochoa I., Gao L., Peretz J., Basavarajappa M. S., Bunting S. L., Karman B. N., Paulose T. ja Flaws J. A. (2013) Follicle-stimulating hormone responsiveness in

- antral follicles from aryl hydrocarbon receptor knockout mice. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E 11: 26
- Hirshfield A. N. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *International review of cytology* 124: 43-101
- Hsueh A. J., Adashi E. Y., Jones P. B. ja Welsh T. H., Jr. (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine reviews* 5: 76-127
- Hunzicker-Dunn M. ja Maizels E. T. (2006) FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular signalling* 18: 1351-1359
- Ikuta T., Kobayashi Y. ja Kawajiri K. (2004a) Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 317: 545-550
- Iyer A. K., Brayman M. J. ja Mellon P. L. (2011) Dynamic chromatin modifications control GnRH gene expression during neuronal differentiation and protein kinase C signal transduction. *Mol Endocrinol* 25: 460-473
- Kaipia A. ja Hsueh A. J. (1997) Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual review of physiology* 59: 349-363
- Ko C. I., Wang Q., Fan Y., Xia Y. ja Puga A. (2014) Pluripotency factors and Polycomb Group proteins repress aryl hydrocarbon receptor expression in murine embryonic stem cells. *Stem cell research* 12: 296-308
- Kondo Y. (2009) Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei medical journal* 50: 455-463
- Kumar T. R., Wang Y., Lu N. ja Matzuk M. M. (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics* 15: 201-204
- LaVoie H. A. (2005) Epigenetic control of ovarian function: the emerging role of histone modifications. *Molecular and cellular endocrinology* 243: 12-18
- Lavrov S. A. ja Kibanov M. V. (2007) Noncoding RNAs and chromatin structure. *Biochemistry. Biokhimiia* 72: 1422-1438
- Lawson K. A. ja Hage W. J. (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Foundation symposium* 182: 68-84; discussion 84-91
- Lee L., Asada H., Kizuka F., Tamura I., Maekawa R., Taketani T., Sato S., Yamagata Y., Tamura H. ja Sugino N. (2013) Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology* 154: 458-470
- Lindsey S. and Papoutsakis E.T. (2012) The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis. *Stem Cell Rev* 8 : 1223-1235
- Livak K. J. ja Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402-408
- Manna P. R., Pakarainen P., Rannikko A. S. ja Huhtaniemi I. T. (1998) Mechanisms of desensitization of follicle-stimulating hormone (FSH) action in a murine granulosa cell line stably transfected with the human FSH receptor

- complementary deoxyribonucleic acid. *Molecular and cellular endocrinology* 146: 163-176
- Meyer B. K. ja Perdew G. H. (1999) Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 38: 8907-8917
- Mimura J., Ema M., Sogawa K., Ikawa S. ja Fujii-Kuriyama Y. (1994) A complete structure of the mouse Ah receptor gene. *Pharmacogenetics* 4: 349-354
- Mimura J., Ema M., Sogawa K. ja Fujii-Kuriyama Y. (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & development* 13: 20-25
- Mimura J. ja Fujii-Kuriyama Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et biophysica acta* 1619: 263-268
- Moenter S. M., Caraty A. ja Karsch F. J. (1990) The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127: 1375-1384
- Muller C. ja Leutz A. (2001) Chromatin remodeling in development and differentiation. *Current opinion in genetics & development* 11: 167-174
- Nan X., Ng H. H., Johnson C. A., Laherty C. D., Turner B. M., Eisenman R. N. ja Bird A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389
- Ng H. H. ja Bird A. (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Current opinion in genetics & development* 9: 158-163
- Nguyen N.T., Hanieh H., Nakahama T. and Kishimoto T. (2013) The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int Immunol* 25 : 335-343
- Nimz M., Spitschak M., Furbass R. ja Vanselow J. (2010) The pre-ovulatory luteinizing hormone surge is followed by down-regulation of CYP19A1, HSD3B1, and CYP17A1 and chromatin condensation of the corresponding promoters in bovine follicles. *Molecular reproduction and development* 77: 1040-1048
- Pepling M. E. ja Spradling A. C. (1998) Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125: 3323-3328
- Pepling M. E. ja Spradling A. C. (2001) Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental biology* 234: 339-351
- Peters J. M., Narotsky M. G., Elizondo G., Fernandez-Salguero P. M., Gonzalez F. J. ja Abbott B. D. (1999) Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 47: 86-92
- Phelan D., Winter G.M., Rogers W.J., Lam J.C. and Denison M.S. (1998) Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357 : 155-163
- Quinones-Jenab V., Jenab S., Ogawa S., Funabashi T., Weesner G. D. ja Pfaff D. W. (1996) Estrogen regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue. *Brain research. Molecular brain research* 38: 243-250
- Richards J. S. (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine reviews* 15: 725-751

- Richards J. S., Russell D. L., Ochsner S. ja Espey L. L. (2002) Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual review of physiology* 64: 69-92
- Salvador L. M., Park Y., Cottom J., Maizels E. T., Jones J. C., Schillace R. V., Carr D. W., Cheung P., Allis C. D., Jameson J. L. ja Hunzicker-Dunn M. (2001) Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *The Journal of biological chemistry* 276: 40146-40155
- Salvador L. M., Maizels E., Hales D. B., Miyamoto E., Yamamoto H. ja Hunzicker-Dunn M. (2002) Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 143: 2986-2994
- Sarkar D. K., Chiappa S. A., Fink G. ja Sherwood N. M. (1976) Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature* 264: 461-463
- Schmidt J. V., Carver L. A. ja Bradfield C. A. (1993) Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *The Journal of biological chemistry* 268: 22203-22209
- Schwanhaussner B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W. ja Selbach M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342
- Stocco C. (2008) Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73: 473-487
- Zhang J., Watson A. J., Probst M. R., Minehart E. ja Hankinson O. (1996) Basis for the loss of aryl hydrocarbon receptor gene expression in clones of a mouse hepatoma cell line. *Molecular pharmacology* 50: 1454-1462
- Teino I., Matvere A., Kuuse S., Ingerpuu S., Maimets T., Kristjuhan A. ja Tiido T. (2014) Transcriptional repression of the Ahr gene by LHCGR signaling in preovulatory granulosa cells is controlled by chromatin accessibility. *Molecular and cellular endocrinology* 382: 292-301
- Toda K., Takeda K., Okada T., Akira S., Saibara T., Kaname T., Yamamura K., Onishi S. ja Shizuta Y. (2001) Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. *The Journal of endocrinology* 170: 99-111
- Walker D. M. ja Gore A. C. (2011) Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nature reviews. Endocrinology* 7: 197-207
- Whitlock J. P., Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39: 103-125
- Wincent E., Bengtsson J., Mohammadi Bardbori A., Alsberg T., Luecke S., Rannug U. and Rannug A. (2012) Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 : 4479-4484.

Kasutatud veebiaadressid

http://www.infertile.com/brochures/biological_clock04.htm

Lisad

Lisa 1. Loomkatsete luba



ASUTUSESISESEKS KASUTAMISEKS
PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM
Märge tehtud "22" mail 2014 . a .
Juurdepääsupiirang kehtib kuni 22.05.2019"
või
Alus: Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,

PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

OTSUS
Infotehnoloogia vahendusel

22. mai 2014. a nr 33

Loomkatseprojekti luba

Loomakaitseseaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 13.-16. maini 2014. a toimunud istungi protokoll nr 15 kohaselt otsustati järgmist.

1. Anda luba **Tarmo Tiido**le (sünd. 02.02.1971, aadress Riia 23, Tartu 51010) loomkatseprojekti „**AHR-i regulatsioonimehhanismide uurimine hiire munasarjafolliikuli granulosaarakkudes**“, läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1.1. loomkatseprojekti kavandaja ja loomkatseprojekti eest vastutav isik: **Sulev Kuuse** (sünd. 15.01.1962, aadress Riia 23, Tartu 51010);

1.2. Loomkatseprojekti läbiviimisesse kaasatud isik: **Indrek Teino** (sünd. 08.12.1985, aadress Riia 23-127, Tartu, 51010)

1.3. loomkatseprojekti läbiviimise aeg ja kohad: alates **01.06.2014 kuni 31.05.2016**, Tartu Ülikooli TÜ MRI vivaariumis, ettevõtte tunnustamise otsus nr 14 KL 1202, aadress Riia 23, Tartu 51010;

1.4. katseloomade liik ja arv: 200 emast C57BL/6J (vanus 21 päeva) hiirt. Esimesel aastal 110 ning teisel aastal 90 hiirt.

1.5. loomkatses rakendatavad menetlused:

Esimese rühma moodustavad 21 päeva vanused hiired, kellele rakendatakse eutanaasiat (tservikaalne dislokatsioon).

Teise rühma moodustavad 21 päeva vanused hiired, kellele süstitakse kõhuõõnde FSH (folliikuleid stimuleeriv hormoon), mis tingib suure hulga munasarja folliikulite kasvu ning küpsemise, või kontrollina süstelahust. 48 tundi hiljem rakendatakse eutanaasiat ning eraldatakse granulosaarakud.

Kolmanda rühma moodustavad 21 päeva vanused hiired, kellele süstitakse 48h pärast FSH-d inimese koorioni gonadotropiini (hCG) või kontrollina süstelahust.12 tundi hiljem rakendatakse eutanaasiat ning eraldatakse granulosaarakud.

FSH (PMSG) ning hCG hangitakse lüofiliseeritud kujul, millele on pakendis kaasa pandud lahusti. Katsele eelnevalt lahustatakse hormoonid steriilses keskkonnas (0,5

RÜ/µl) ning säilitatakse +4 °C juures kuni 24 tundi. Lõpplahuse valmistamiseks lahjendatakse see lõppkontsentratsioonini 5RÜ / 100µl, mis süstitakse hiirte kõhuõõnde. Pärast kõhuõõnde süstimist jälgitakse ning hinnatakse hiirte käitumist, välistades sellega võimalike tüsistuste teket (nt. ekslik soolde/maksa süstimine). Kui peaks ilmnenema süstimisest või manustatavast ainest tingitud kõrvalnähud (näiteks looma kaalu langus, söögiisu kadumine, närvilisus, temperatuuri tõus, mida mõõdetakse rektaalselt), siis loom hukatakse kasutades tservikaalse dislokatsiooni meetodit. Katses olnud loomadel rakendatakse humaanse lõpp-punkti strateegiat vastavalt OECD reeglitele ning lähtuvalt 3R põhimõtetest.

2. Otsust on õigus vaidlustada haldusmenetluse seaduses või halduskohtumenetluse seadustikus ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

Sirje Jalakas
/allkirjastatud digitaalselt/

Komisjoni aseesimees

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Antti Matvere

(sünnikuupäev: 7. september 1990. a)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Arüüsüsivesinike retseptori ekspressioonimehhanismide uurimine hiire granuloosarakkudes, mille juhendajad on Tarmo Tiido ja Indrek Teino,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 26.05.2018 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015